

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1938

N°

680

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme Universitaire)

PAR

Norbert FETHKE

Né le 21 Août 1904, à Bydgoszcz (Pologne)

**CONSTITUTION CHIMIQUE
DES
SUBSTANCES LIPOIDIQUES
DU
BACILLE TUBERCULEUX
ET SES RAPPORTS AVEC
L'INFECTION BACILLAIRE**

Travail de l'Institut Pasteur (Laboratoire de Chimie de la Tuberculose)

Président : M. M. POLONOVSKI, Professeur

Lucien CARIO, Imprimeur

13, Pass. Trubert-Bellier

PARIS (XIII^e)

1938

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme Universitaire)

PAR

Norbert FETHKE

Né le 21 Août 1904, à Bydgoszcz (Pologne)

CONSTITUTION CHIMIQUE
DES
SUBSTANCES LIPOIDIQUES
DU
BACILLE TUBERCULEUX
ET SES RAPPORTS AVEC
L'INFECTION BACILLAIRE

Travail de l'Institut Pasteur (Laboratoire de Chimie de la Tuberculose)

Président : M. M. POLONOVSKI, Professeur

Lucien CARIO, Imprimeur
13, Pass. Trubert-Bellier
PARIS (XIII^e)
1938



FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

Le Doyen TIFFENEAU.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie.	ROUVIÈRE.
Physiologie.	LÉON BINET.
Physique médicale.	STROHL.
Chimie médicale.	POLONOVSKI.
Bactériologie.	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale.	BAUDOUIN.
Pathologie médicale.	ABRAMI.
Pathologie chirurgicale.	CHEVASSU.
Anatomie pathologique.	N.
Histologie.	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale.	TIFFENEAU.
Thérapeutique.	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive.	TANON.
Médecine légale.	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée.	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.	CHIRAY.
Clinique médicale.	LOEPER.
	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance.	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants.	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies du système nerveux.	GOUGEROT.
Clinique des maladies infectieuses.	GUILLAIN.
	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale.	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique.	TERRIEN.
Clinique urologique.	MARION.
	LÉVY-SOLAL.
Clinique d'accouchements.	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	LEMAÎTRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale.	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.	M. VILLARET.
Clinique de la Tuberculose.	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte.	MATHIEU.
Clinique cardiologie.	LAUBRY.
Clinique d'Assistance Médico-Sociale.	CROUZON.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire.	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.		MM.	
AMELINE	Pathologie chirurgicale.	LAROCHE (Guy)	Pathologie médicale.
BARIÉTY	Pathologie médicale.	LELONG	Pathologie médicale.
BÉNARD (Henri)	Pathologie médicale.	LEMAIRE	Pathologie expérimentale.
BERNARD (Etienne)	Pathologie médicale.	LEVEUF	Pathologie chirurgicale.
BESANÇON (Justin)	Hydrologie.	M ^{lle} J. LÉVY	Pharmacologie.
BOULIN	Pathologie médicale.	LÉVY-VALENSI	Neurologie et Psychiâtrie.
BULLIARD	Histologie.	MÉNÉGAUX	Pathologie chirurgicale.
CATHALA	Pathologie médicale.	MOLLARET	Pathologie médicale.
CHEVALLIER	Pathologie médicale.	MOREAU	Pathologie médicale.
COSTE	Pathologie médicale.	MOULONGUET	Pathologie chirurgicale.
DOGNON	Physique.	MOUQUIN	Pathologie médicale.
FEY	Urologie.	OBERLING	Anatomie pathologique.
FUNCK	Pathologie chirurgicale.	PETIT-DUTAILLIS	Pathologie chirurgicale.
GALLIARD	Parasitologie.	PIÉDELIÈVRE	Médecine légale.
GASTINEL	Bactériologie.	PORTES	Obstétrique.
DE GAUDART D'ALLAINES	Pathologie chirurgicale.	RENARD	Ophtalmologie.
GAYET	Physiologie.	RICHEL	Physiologie.
DE GENNES	Pathologie médicale.	SANNIÉ	Chimie biologique.
GIROUD	Histologie.	SÈNÈQUE	Pathologie chirurgicale.
HAGUENAU	Pathologie médicale.	TROISIER	Pathologie expérimentale.
HALPHEN	Oto - rhino-laryngologie.	TURPIN	Pathologie médicale.
HAZARD	Pharmacologie.	VIGNES	Obstétrique.
HUGUENIN	Anatomie pathologique.	WILMOTH	Pathologie chirurgicale.
JOANNON	Hygiène.		
LACOMME	Obstétrique.		
LANTUÉJOL	Obstétrique.		

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE pour le service des examens

MM.		MM.	
ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.	LARDENNOIS	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET	Pharmacologie.	LEROUX	Anatomie pathologique.
CHAILLEY-BERT	Physiologie.	PHILIBERT	Bactériologie.
		VAUDESCAL	Obstétrique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

MM.		MM.	
ALAJOUANINE.	} Clinique médicale.	BASSET.	} Clinique chirurgicale.
AUBERTIN. . .		BROCQ.	
BRULÉ.		CADENAT. . . .	
CHABROL. . . .		GATELLIER. . . .	
DONZELOT. . . .		HEITZ-BOYER. . .	
DUVOIR.		MOURE.	
LIAN.		QUENU.	
PASTEUR-VAL-		SCHWARTZ. . . .	
LERY-RADOT.		VELTER.	
SÉZARY.			

MM.	
ECALLE.	} Clinique obstétricale.
METZGER.	

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé.	Education physique.
LEDoux-LEBARD.	Radiologie clinique.
PHILIBERT, agrégé	Microbiologie.
RUFFE.	Stomatologie.
WEIL-HALLÉ.	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA SŒUR ET MES FRERES

A TOUS LES MIENS

*Bien faible témoignage de mon
affection et de ma reconnaissance.*

A LA MÉMOIRE DE

MONSIEUR LE DOCTEUR E. RQUX

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Directeur de l'Institut Pasteur

MONSIEUR LE DOCTEUR A. CALMETTE

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur

A MONSIEUR LE DOCTEUR L. MARTIN

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Directeur de l'Institut Pasteur

A MONSIEUR LE DOCTEUR G. RAMON

Membre de l'Académie de Médecine

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur

*Hommage respectueux et très
reconnaissant.*

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Hommage respectueux.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR POLONOVSKI

Président de la Société de Chimie Biologique

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TIFFENEAU

Doyen de la Faculté de Médecine de Paris

Membre de l'Académie de Médecine

Hommage respectueux et reconnaissant.

A MONSIEUR LE DOCTEUR M. A. MACHEBŒUF

*Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux*

Ancien Chef de Service à l'Institut Pasteur

*En témoignage de ma profonde
gratitude.*

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR BEZANÇON
MONSIEUR LE DOCTEUR CHEVRIER
MONSIEUR LE PROFESSEUR VILLARET
MONSIEUR LE DOCTEUR WEIL-HALLE
MONSIEUR LE PROFESSEUR BAUDOUIN
MONSIEUR LE PROFESSEUR LEVY-SOLAL
MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMIERRE
MONSIEUR LE DOCTEUR MILIAN
MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILLAIN
MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMAITRE
MONSIEUR LE PROFESSEUR TERRIEN
MONSIEUR LE PROFESSEUR MARION
MONSIEUR LE PROFESSEUR H. CLAUDE

A MES MAITRES DE L'INSTITUT PASTEUR

MONSIEUR LE DOCTEUR A. BERTHELOT
MONSIEUR LE DOCTEUR L. NEGRE
MONSIEUR LE DOCTEUR E. POZERSKI
MONSIEUR LE DOCTEUR R. LEGROUX
MONSIEUR LE DOCTEUR DUMAS

INTRODUCTION

Dans le présent travail, nous nous proposons d'exposer le rôle que peuvent jouer les substances lipoïdiques du bacille de Koch au cours de l'infection tuberculeuse.

Le problème se rattache par plusieurs points à une question plus générale : celle de savoir quelle est exactement la fonction biologique des lipides dans la matière vivante. Cette question a beaucoup évolué depuis les débuts de la chimie biologique. L'importance des lipides fut tour à tour négligée puis exagérée, aussi nous a-t-il paru qu'il ne serait pas inutile de préciser, au moins sur quelques points, ce qui reste, après toutes ces discussions, de définitivement acquis.

S'il est sûr que les graisses font partie constitutive du protoplasme vivant, il est certain aussi que très souvent elles se séparent de celui-ci pour y former des inclusions plus ou moins inertes. Certes il sera toujours possible d'attribuer un rôle quelconque à ces graisses des inclusions et cela d'autant mieux que l'esprit humain a tendance à se satisfaire d'une explication finaliste.

Mais en réalité l'explication la plus simple est qu'une proportion très notable des lipides et précisément ceux des inclusions paraissent occuper une place d'importance relativement secondaire dans la biologie cellulaire.

Pour ne citer qu'un exemple, rappelons l'évolution de nos connaissances sur ce groupe de corps ou de principes si particuliers que sont les haptènes lipoïdiques (1). Au début des recherches sur ce sujet, on a pensé qu'il s'agissait de

(1) K. LANDSTEINER et P. A. LEVENE, *Journ. Immunol.* 1925, 10, 731.

M. A. MACHEBŒUF, *Revue de Pathologie Comparée*, 1936, 1266.

phosphatides, mais on a vu, au cours des fractionnements ultérieurs, qu'au fur et à mesure que l'activité d'une fraction a augmenté, les substances qui forment celle-ci présentent une constitution s'éloignant de plus en plus de celle des phosphatides classiques et l'on a bien dû reconnaître qu'il s'agissait de mélanges plus ou moins complexes d'autres substances.

Nous ne voulons pas parler du rôle purement quantitatif des graisses, de leur métabolisme, de leur utilisation en tant que source de carbone et d'énergie, mais de leur rôle dynamique et, à ce point de vue, il faut être très circonspect.

En fait, le problème se pose un peu différemment pour le sujet assez particulier, dont nous nous sommes occupé. Il s'agit, en effet, du rôle physiopathologique des substances lipoidiques du bacille de la tuberculose.

A première vue, des relations frappantes paraissent exister entre certaines particularités de l'infection bacillaire et la présence dans l'agent microbien de celle-ci de quantités relativement importantes de graisses assez spéciales.

La lenteur d'évolution de l'infection, l'extraordinaire résistance du bacille de Koch aux agents physiques et chimiques, la présence dans les tissus infectés, autour des corps microbiens, d'éléments cellulaires particuliers retiennent tout d'abord l'attention. Dans un tout autre ordre d'idées on est amené à considérer les curieux caractères tinctoriaux des bacilles et la composition toute spéciale de ceux-ci, surtout en ce qui concerne leurs constituants lipoidiques. Il n'y a peut-être qu'un pas à faire pour unir ces deux groupes de caractères en expliquant par la constitution chimique et les propriétés physiques des graisses bacillaires les particularités de l'infection tuberculeuse.

Mais toutes ces hypothèses, si attrayantes qu'elles soient dans leur simplicité, doivent être discutées avec soin. Il faut examiner point par point et les propriétés physicochimiques des graisses du bacille tuberculeux et les caractères histologiques et physio-pathologiques de l'infection bacillaire. C'est alors seulement que le problème apparaîtra dans toute sa clarté et que nous pourrons fonder notre

conception non plus sur une hypothèse émise à la légère, mais sur des faits bien précis.

Nous allons voir, en effet, que la relation qui paraît exister entre la constitution chimique des substances lipoidiques du bacille tuberculeux et l'infection bacillaire est loin d'être aussi simple qu'on a pu le croire de prime abord.

Toutefois notre étude restera dans les limites d'une simple esquisse et nos conclusions ne seront que des hypothèses de travail. Mais, cependant, les quelques précisions que nous apportons sur le rôle des substances lipoidiques dans la pathogénie de la tuberculose, nous semblent éclairer d'une lumière nouvelle le mécanisme si complexe de la lutte de l'organisme contre le bacille de Koch.

Peut-être même pourraient-elles nous aider quelque peu à améliorer les méthodes thérapeutiques, qui se proposent de rendre plus efficaces nos moyens de défense contre l'infection bacillaire.

Avant d'exposer mes recherches et les quelques résultats qu'elles m'ont permis d'obtenir, je tiens à rendre un hommage profondément reconnaissant à la mémoire de M. le docteur Roux qui a daigné m'admettre à l'Institut Pasteur.

Je garde, à la mémoire de M. le Docteur Albert CALMETTE, une sincère et profonde gratitude. J'ai eu l'honneur de travailler sous sa direction et de bénéficier aussi bien de ses conseils que de ses encouragements. C'est à lui, enfin, que je dois d'avoir pu continuer mes études scientifiques et médicales.

Je tiens à remercier très vivement M. le Docteur Louis MARTIN qui a eu la grande bonté de m'autoriser à continuer mes recherches et à qui je dois de pouvoir en publier les résultats.

Je remercie également M. le Docteur G. RAMON pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour toute la bienveillance qu'il m'a témoignée.

C'est sur les conseils de mon maître, M. le Docteur MACHEBŒUF, que j'ai entrepris l'étude des lipides du bacille tuberculeux. Pendant sept ans il n'a pas cessé de me guider amicalement dans mes recherches et de me témoigner sa

sympathie en m'associant à maintes reprises à ses travaux. Il m'est très agréable de trouver enfin l'occasion de lui en exprimer ma bien vive reconnaissance.

Je tiens enfin à remercier sincèrement M. le Docteur M. POLONOVSKI d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'examiner ma thèse, d'en autoriser l'impression et d'en présider la soutenance.

CHAPITRE PREMIER

ETUDE COMPARATIVE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET DES CARACTÈRES PHYSICOCIMIQUES DES SUBSTANCES LIPOIDIQUES DES BACILLES TUBERCULEUX ET DE CELLES DES AUTRES ÊTRES VIVANTS

ETUDE QUANTITATIVE DES SUBSTANCES LIPOIDIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX

Les bacilles tuberculeux sont extraordinairement riches en substances lipoïdiques. Celles-ci, en effet, peuvent constituer jusqu'à 30 % du poids sec des bacilles.

Nous comprenons ici, comme substances lipoïdiques, les substances extractibles par les solvants dits des graisses, et qui sont finalement solubles dans l'éther et le benzène.

Pour les données analytiques indiquées dans la littérature, la technique d'extraction peut jouer un certain rôle. En effet, les premiers auteurs qui se sont occupés de la question, ont employé des techniques fort imparfaites. Tout d'abord leurs méthodes d'extraction ne permettaient d'obtenir qu'une certaine proportion des lipides totaux et d'autre part leurs extraits ne devaient pas seulement contenir des substances lipoïdiques. A ce sujet d'ailleurs, il est intéressant de remarquer que les méthodes classi-

ques d'extraction actuellement employées (méthode de Kumagava-Suto en particulier) ne paraissent pas aboutir à la dissolution intégrale des graisses contenues dans les corps bacillaires. Il faudrait un traitement par les bases ou les acides pour rendre accessibles à l'extraction à l'aide des solvants habituels une certaine proportion des substances lipoïdiques totales. Ce fait observé par les premiers auteurs fut confirmé récemment par ANDERSON et ses collaborateurs (2). Nous ne nous prononçons pas définitivement à ce sujet; mentionnons cependant qu'aucun des auteurs qui ont parlé de ces graisses cachées ne s'est servi de la méthode classique de Kumagava-Suto pour doser les substances lipoïdiques « libres ». ANDERSON en particulier, n'emploie pas l'alcool chaud. Nous pensons donc finalement que le problème des graisses « liées » n'est pas encore résolu.

Acceptons les chiffres indiqués dans le texte avec ces petites réserves, en disant cependant que l'erreur qu'ils peuvent comporter ne doit pas être très considérable.

Nous apportons ici les résultats obtenus par CHARGAFF et DIERYCK (3) (Technique d'Anderson, page 39).

Tableau n° 1

Souches bacillaires	Substances lipoïdiques %
Souche humaine	10,5 à 12,0
Souche bovine, groupe I.....	15,8 à 18,0
Souche bovine, groupe II (comprenant en particulier la souche Vallée et le B.C.G. qui en dérive	24,7
Souche aviaire	15,3
Bacille de la tortue de Friedmann.....	18,3
Bacille paratuberculeux de la fléole.....	8,4
Bacille du smegma	13,2

Nous voyons que les teneurs en substances lipoïdiques varient beaucoup avec l'espèce et même avec la variété des bacilles.

Nous nous demandons cependant si ces chiffres ont au moins une signification pour une souche microbienne don-

(2) R. J. ANDERSON, R. E. REEVES et F. H. STODOLA, *Journ. of. Biol. Chem.* 1937, 121, 649.

(3) E. CHARGAFF et J. DIERYCK, *BIOCHEM. ZTSCHR.* 1932, 255, 319.

née et si la teneur en graisse n'est pas soumise à des variations, même dans les conditions physiologiques, pour une même souche.

Nous trouvons à ce sujet des faits en réalité fort déconcertants. Ainsi l'âge de la culture a une certaine influence sur la teneur totale en substances lipoidiques; les cultures plus âgées ont une teneur plus élevée.

La constitution du milieu de culture a, elle aussi, une influence certaine sur la teneur en graisses. Ainsi, comme CHARGAFF (4) l'a montré, les bacilles cultivés sur bouillon glycérimé ont en général une teneur en substances lipoidiques plus forte que ceux provenant de milieux synthétiques. Il s'agit d'ailleurs essentiellement de l'augmentation des graisses de la fraction acétonique, fait dont l'importance va être discutée plus loin.

Tableau n° 2
Teneur en substances lipoidiques
en fonction du milieu de culture

	BACILLE HUMAIN (3)		BACILLE AVIAIRE (4)		BACILLE DE LA FLÉOLE (4)	
	Milieu de Sauton	Bouillon	Milieu de Long	Bouillon	Milieu de Long	Bouillon
Graisses.....	3,3	6,3	2,2	11,5	2,8	9,1
Phosphatides	3,9	4,2	2,3	2,0	0,6	1,7
Cires.....	4,5	3,5	10,8	11,0	5,0	1,1
Lipides totaux	11,9	14,0	15,3	24,3	8,4	11,9

M. FROUIN et Mlle M. GUILLAUMIE (5) ont constaté également une relation manifeste entre la teneur en graisses des bacilles tuberculeux et la constitution du milieu de culture. Ainsi la teneur en graisses augmente progressivement lorsque la teneur en glycérine du milieu de culture augmente,

(4) E. CHARGAFF, ZTSCHR. f. Physiol. Chem. 1931, 201, 198.

(5) A. FROUIN et M. GUILLAUMIE, Bull. Soc. Chim. Biol. 1926, 8, 1178.

jusqu'à atteindre un maximum pour une certaine concentration optimale en glycérine.

D'autre part, une souche récemment isolée de l'organisme animal ou humain contient une proportion réduite de substances lipoidiques et cette teneur paraît augmenter à mesure de l'adaptation aux conditions artificielles de culture.

Mais quelle est la signification exacte de ces variations observées dans la teneur en graisses des bacilles ? En effet, dans tous les cas il y avait non seulement une diminution dans la teneur en graisses, mais aussi une diminution du rendement total de la culture. Somme toute, les cultures furent « maigres » à tous les points de vue. Ainsi, lorsque la teneur en glycérine diminue au-dessous de l'optimum, l'abondance de la culture diminue en même temps que sa teneur en graisses. Il en est de même pour une souche récemment isolée, essentiellement « dysgonique » (suivant la terminologie bactériologique moderne) dont la teneur en graisses augmente à mesure qu'elle pousse de mieux en mieux dans les conditions artificielles.

Ces restrictions faites concernant les variations dues au milieu, nous pouvons tout de même maintenir que le bacille tuberculeux est très riche en graisses ; nous pouvons conclure, qu'en réalité, les variations observées dans la teneur en graisses ne sont pas physiologiques dans le sens propre du mot et que les bacilles qui poussent maigrement avec une teneur en graisses faible sont des bacilles malades, qui souffrent dans des conditions de culture non adéquates. Nous devons donc accepter finalement avec une valeur entière, les chiffres rapportés ci-dessus (page 18), chiffres qui concernent précisément des bacilles obtenus dans de bonnes conditions de culture (milieu de Sauton, de Long, bouillon glyciné). Si nous comparons alors ces chiffres à ceux obtenus pour d'autres microorganismes, nous trouvons que réellement la place occupée par les bacilles acido-résistants est tout à fait particulière.

Nous avons rapporté ci-dessus quelques chiffres d'extraits lipoidiques calculés pour 100 gr. du poids des corps bacillaires secs. Nous voyons que, même la souche du

bacille tuberculeux la moins riche en graisses (12 %) (6), en contient encore sensiblement plus que le bacille acido-phile (7) et le bacille diphtérique (8) par exemple. En général les bacilles autres que les acidorésistants ont une teneur en graisses de l'ordre de 5 à 8 %. Nous pouvons donc conclure que le groupe des bacilles acidorésistants en général, et le bacille tuberculeux en particulier, sont en moyenne trois fois plus riches en graisses que les autres microorganismes. Ce fait, en lui-même, peut faire prévoir la possibilité d'un rôle particulier joué par les graisses dans l'infection tuberculeuse.

(6) CHARGAFF et J. DIERYCK, *BIOCHEM. ZTSCHR.* 1932, 255, 319.

(7) J. A. CROWDER et R. J. ANDERSON, *Journ. of. Biolog. Chem.* 1934, 104, 399.

(8) M. A. MACHEBŒUF et H. CASSAGNE, *C. R. Ac. Sc.* 1935, 200, 1988.

E. CHARGAFF, *ZEITSCHR. f. Physiol. Chem.* 1931, 201, 191 ; 218, 223.

ETUDE COMPARATIVE DES GRAISSES DU BACILLE TUBERCULEUX ET DES GRAISSES DES AUTRES CELLULES VIVANTES ANIMALES OU VEGETALES

Nous avons vu que le bacille de Koch contient une proportion notable de substances lipoïdiques. Pour connaître le rôle que ces substances lipoïdiques pourraient jouer dans l'infection tuberculeuse, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'examiner, avant tout, quelle est la place qu'occupent ces graisses dans les cellules microbiennes, et du point de vue biologique et du point de vue histologique. Pour avoir quelques renseignements à ce sujet, il faudrait tout d'abord considérer les différences qui existent entre les graisses bacillaires et les substances lipoïdiques d'autres origines animales ou végétales, puis rechercher les rapprochements possibles entre les propriétés physiques et la constitution chimique de ces divers groupes de graisses.

On peut démontrer, en général, un parallélisme assez étroit entre l'indice d'iode* et le point de fusion des graisses, car, tandis que les acides gras saturés comme l'acide palmitique et l'acide stéarique sont solides, les acides gras non saturés sont liquides à la température ambiante et abaissent ainsi le point de fusion des graisses. Ceci étant vrai pour les acides gras eux-mêmes et pour les esters, l'est également pour les lipides, car, ne l'oublions pas, ceux-ci sont des esters par définition. De plus, les constituants alcooliques des esters peuvent intervenir pour influencer l'indice d'iode ; ainsi les stérols ont des doubles liaisons, mais leur point de fusion n'est pas en rapport étroit avec leur indice d'iode. Et, même pour les acides gras, ce

* Définition de l'indice d'iode : C'est le poids d'iode fixé par l'unité de poids multipliée par cent d'une substance considérée. L'iode étant fixé principalement par les doubles liaisons des substances organiques, l'indice d'iode est une mesure de la non saturation.

parallélisme n'est pas rigoureux. En effet, récemment, on a mis en évidence l'existence d'acides gras ramifiés qui sont liquides même quand ils sont saturés. Cependant de telles substances se trouvent dans la nature en quantité peu considérable par rapport à la totalité des graisses et malgré ces restrictions, nous pouvons conclure qu'il persiste toujours un parallélisme assez marqué entre l'indice d'iode et le point de fusion des substances lipoïdiques.

Prenons d'abord les représentants les plus typiques des lipides végétaux, les graisses des graines appelées « huiles végétales », et comparons-les ensuite à celles qui proviennent du bacille tuberculeux.

Tableau n° 3

Huiles végétales (9)

	Point de fusion	Indice d'iode
Huile de lin	—16° à —27°	164 à 194
Huile d'olive	0° à 6°	79 à 83
Huile de ricin	—10° à —18°	82 à 91

Tableau n° 4

Bacille tuberculeux

Auteurs	Point de fusion	Indice d'iode
Kresling (10)	56°	9,82
Goris (11)	42°	16,22

Nous voyons une grande différence aussi bien pour le point de fusion que pour l'indice d'iode. Nous pouvons donc dire que les substances lipoïdiques du bacille tuberculeux ne sont nullement comparables aux huiles végétales.

Mais, dirons-nous, la température à laquelle vit l'organisme intervient peut-être pour modifier les graisses dont cet organisme effectue la synthèse. En effet, le bacille tuberculeux se trouve à la température de son hôte et, dans le cas qui nous intéresse, celui-ci est un homéotherme (ou dans

(9) M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL, Chimie organique biologique, 1934, 255, Masson et C^{ie}, éditeurs.

(10) KRESLING, Berl. Klin. Woch. 101, 30, 896 et 83, 569.

(11) A. GORIS, Ann. Inst. Pasteur 1920, 34, 497.

les conditions artificielles à l'étuve à 37°). Les végétaux, par contre, se développent à une température variable et généralement beaucoup inférieure.

En effet, on a constaté que les plantes des tropiques ont des huiles de consistance plus ferme. D'autre part, on a trouvé dans le règne animal, que les poissons et les poïkilothermes ont des graisses plus fluides que les homéothermes.

Comparons donc les graisses du bacille tuberculeux à celles des homéothermes.

Tableau n° 5

Graisses animales (12)

	Point de fusion	Indice d'iode
Beurre de vache.....	28° à 33°	26 à 38
Graisse humaine	17,5°	57 à 66
Graisse de bovidés.....	42° à 49°	35 à 45
Graisse de porc.....	36° à 46°	50 à 70
Graisse de cheval.....	20° à 42°	79 à 94
Bacille tuberculeux	42° à 56°	10 à 16

Les bacilles tuberculeux contiennent ainsi une graisse dont la consistance est sensiblement plus ferme et l'indice d'iode inférieur aux graisses des animaux à sang chaud.

Nous arrivons donc à la conclusion que la température à laquelle vivent les bacilles tuberculeux ne peut expliquer à elle seule cette dissemblance dans la constitution. Il doit y avoir une différence constitutionnelle très profonde.

Mais est-il légitime de comparer des êtres unicellulaires comme le bacille tuberculeux à des êtres aussi différenciés que les organismes supérieurs ? Ces graisses du bacille de Koch caractérisent peut-être les microorganismes, tout comme les graisses précédemment citées caractérisent les organismes supérieurs.

Nous apportons plus loin des analyses détaillées de divers microorganismes ; nous verrons que leurs substances lipoidiques se rapprochent plutôt des huiles végétales et

(12) CARL OPPENHEIMER, Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, Jena, 1924, vol. I, 105 à 108.

animales. Dans le cas du bacille tuberculeux, il ne s'agit donc pas de graisses spécifiques des microorganismes, mais celles-ci conservent entièrement leurs particularités et nous n'avons pas encore réussi à trouver une ressemblance avec les graisses d'autres cellules vivantes.

En réalité, nous pouvons rencontrer dans le règne animal et dans le règne végétal certains produits d'excrétion de nature lipoïdique : les cires qui ressemblent un peu, par leurs propriétés physiques et leur indice d'iode, aux substances lipoïdiques du bacille tuberculeux.

Tableau n° 6

Cires animales et végétales

	Point de fusion	Indice d'iode
Cires d'abeilles (12)	52° à 55°	8 à 11
Cires d'insectes	81° à 83°	1 à 2
Cires du Japon (9).....	48° à 55°	4 à 13
Cires de Myrica	40° à 48°	10 à 11
Bacille tuberculeux	42° à 56°	10 à 16

Les graisses du bacille tuberculeux ne se rapprochent donc pas par leur aspect et leur consistance des graisses végétales ou animales de réserve ou des substances lipoïdiques d'autres microorganismes, mais elles paraissent montrer, au contraire, quelque ressemblance avec les cires, produits d'excrétion des insectes et des plantes supérieures.

CONSTITUTION CHIMIQUE DES SUBSTANCES LIPOIDIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX

En considérant uniquement les deux paramètres, indice d'iode et point de fusion, nous n'avons trouvé de rapprochement réel qu'entre les graisses du bacille tuberculeux et les cires animales et végétales.

Nous verrons que le problème est loin d'être aussi simple ; en effet, si on considère leur constitution chimique, les graisses du bacille tuberculeux se détachent nettement de toutes les autres graisses animales, végétales, ou même microbiennes.

Pour bien classer ces substances lipoïdiques, nous devons reprendre notre étude des diverses graisses des êtres vivants. Nous allons trouver tout d'abord quelques particularités, communes aux graisses des bacilles tuberculeux et à celles des autres bactéries et qui différencient ces deux groupes d'avec les autres êtres.

Glycérides *

Si chez les animaux et les végétaux supérieurs la fraction prépondérante des lipides est constituée par des glycérides, nous serons surpris de trouver dans les graisses du bacille tuberculeux une teneur en glycérides assez faible, moins de 12 % des substances lipoïques totales (calculé à partir du glycérol dosé) (13). Et ceci est d'autant plus surprenant que le bacille tuberculeux accepte de préférence le glycérol comme source de carbone.

* Les glycérides sont les esters simples les plus répandus. Dans ces esters l'alcool est le glycérol ; les acides les plus répandus sont d'une part les acides gras saturés, comme l'acide palmitique et stéarique, d'autre part l'acide gras non saturé, comme l'acide oléique.

(13) M. A. MACHEBŒUF, G. LÉVY et N. FETHKE, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934, 16, 371.

Cette teneur peu élevée en glycérides du bacille tuberculeux est un fait qu'on retrouve chez d'autres bactéries, par exemple dans le bacille diphtérique et le vibron cholérique *, tandis que, déjà chez les levures, la teneur en glycérides est élevée.

Stérides *

Les stérides, si répandus chez les êtres vivants (esters à base de cholestérol, phytostérol, ergostérol) même chez les êtres unicellulaires, comme les levures, ne sont que très peu abondants chez les bactéries.

Pour le bacille tuberculeux cette question est très discutée. Peut-être existe-t-il quand même des stérides en quantité minime, en combinaison avec d'autres constituants du bacille (protéides, glucides) et qui rendent difficile leur extraction. En effet, tout récemment, HECHT (14) a obtenu après extraction à l'acétone et l'éther de pétrole à froid, un extrait à l'éther de pétrole à chaud, pour lequel les réactions de coloration des stérols sont positives. Il est vrai, que plusieurs auteurs attribuent ces petites quantités de stérols décelés aux impuretés provenant des réactifs (15). Il est donc fort probable que des stérols à proprement parler n'existent pas plus chez le bacille tuberculeux que chez les autres bactéries.

Pouvons-nous en déduire définitivement que les dérivés du noyau phénanthrénique (acides biliaires, vitamine D, hormones sexuelles, etc.) si répandus dans les autres groupes d'êtres vivants manquent totalement chez les bactéries en général et chez les bacilles tuberculeux en particulier ? Nous croyons qu'une telle conclusion serait encore prématurée. En effet, l'étude des lipides des bactéries n'est pas

* Travail effectué au laboratoire du professeur M. A. MACHEBŒUF.

* Les stérides sont des esters formés par des alcools cycliques non aromatiques (ne contenant pas le noyau benzénique) à poids moléculaire oscillant autour de C 27; ce sont donc des esters comme les glycérides, avec cette différence que le glycérol est remplacé par un stérol.

(14) E. HECHT, ZTSCHR. f. Physiol. Chem. 1935, 231, 29.

(15) R. J. ANDERSON, R. SCHÖNHEIMER, J. A. CROWDER et F. H. STODOLA, Ztschr. f. Physiol. Chem. 1935, 237, 40.

encore suffisamment avancée pour que l'on puisse affirmer avec certitude que certaines fractions de ceux-ci ne contiennent pas, dans le cas particulier des bacilles tuberculeux, des noyaux hydroaromatiques dérivant du phénanthrène.

Acides Gras

Nous avons étudié jusqu'ici les graisses en prenant comme guide plutôt le constituant alcoolique, glycérol ou stérol. Nous avons vu que les glycérides ne se trouvent qu'en petite quantité dans les substances lipoïdiques du bacille tuberculeux. En ce qui concerne les stérides, nous pouvons conclure qu'ils n'existent pas dans les bacilles tuberculeux ou tout au moins qu'il n'y en a que des traces.

Passons maintenant à l'étude des autres constituants de ces esters, constitutants qui peuvent aussi, d'ailleurs, exister à l'état libre dans les corps bacillaires. Nous voulons parler des acides gras. Jusqu'à maintenant il s'agissait de caractères communs aux graisses de toutes les bactéries et distincts seulement de ceux des autres organismes vivants ; mais l'étude des acides gras va nous montrer des particularités propres aux bacilles tuberculeux, ou tout au moins caractéristiques du groupe des bacilles acidorésistants.

Les acides gras à poids moléculaire élevé *, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique qui sont les plus répandus dans la nature, constituent aussi une proportion importante des acides gras des bacilles tuberculeux. Cependant ANDERSON (16) a démontré la présence de deux

* Ces acides gras sont linéaires à nombre paire d'atomes de carbone et en particulier l'acide palmitique en C_{16} et l'acide stéarique en C_{18} :

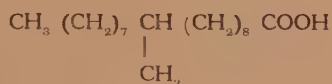


Les acides saturés sont solides à la température ambiante. Les acides gras non saturés (acide oléique par exemple) sont par contre liquides à la température ordinaire. Ils correspondent aux acides saturés et présentent une ou plusieurs doubles liaisons $RHC=CHR$, qui peuvent fixer de l'iode ou de l'hydrogène.

(16) R. J. ANDERSON, *Journ. of. Biol. Chem.* 1927, 74, 537 et 1929, 83; 169. — R. J. ANDERSON et E. CHARGAFF, *Journ. of. Biol. Chem.* 1929, 85, 77. — ZTSCHR. f. Physiol. Chem. 1930, 191, 157. — M. A. SPIELMAN, et R. J. ANDERSON, *Journ. of. Biol. Chem.* 1935, 112, 759.

acides gras liquides, saturés et à chaîne ramifiée qu'il a appelés acide tuberculostéarique et acide phtioïque.

SPIELMAN (17) a pu éclaircir la constitution de l'un de ces acides : l'acide tuberculostéarique dont nous indiquons ici la formule



Son point de fusion est bas : 10 à 11° ; il est donc liquide à la température ordinaire. Nous voyons qu'il s'agit d'un acide à 19 atomes de carbone, assez proche donc de l'acide stéarique. Mais cet acide possède une chaîne ramifiée et non une chaîne linéaire. Il est sans influence sur la lumière polarisée.

L'autre acide gras liquide saturé *, l'acide phtioïque est optiquement actif, il est dextrogyre (point de fusion 20 à 21°) et possède la formule $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Il s'agit donc fort probablement d'un isomère à chaîne ramifiée de l'acide hexacosanique. L'importance de cet acide hexacosanique est très grande comme nous le verrons par la suite, car c'est à lui que l'on attribue certaines des lésions tissulaires spécifiques du bacille tuberculeux.

Ces deux acides sont-ils caractéristiques des bacilles tuberculeux ?

En réalité, on a pu démontrer encore dans d'autres rares cas l'existence d'acides gras liquides saturés (bacille acidophile, foie du chat) (18), mais dans aucun cas on n'a trouvé de l'acide phtioïque ; et ce dernier n'a même pas

*. On obtient ces acides gras, en effet, sans double liaison; nous ne pouvons cependant affirmer avec certitude s'ils sont saturés dans le corps bacillaire, car au cours de l'isolement de ces acides, on sature la masse totale des acides gras liquides avec de l'hydrogène. Les bacilles lépreux ((19) R. J. ANDERSON, R. E. REEVES et J. A. CROWDER, *Journ. of. Biol. Chem.* 1937, 121, 669) paraissent contenir des acides gras saturés liquides et optiquement actifs autres que l'acide phtioïque. Toutefois il n'est pas encore sûr que l'acide phtioïque soit une espèce chimique et peut-être bien existerait-il, alors, dans les bacilles lépreux en particulier.

(17) M. A. SPIELMAN, *Journ. of. Biol. Chem.* 1934, 106, 87.

(18) J. A. CROWDER et R. J. ANDERSON, *Journ. of. Biol. Chem.* 1934, 104, 399.

été retrouvé avec certitude, au moins sous forme optiquement active, dans les bacilles acidorésistants autres que les bacilles tuberculeux à proprement parler. Ainsi il se peut qu'il soit tout à fait spécifique des bacilles qui causent chez les mammifères l'infection tuberculeuse.

Acides Gras non estérifiés

Les acides gras sont en général, dans la matière vivante, liés aux alcools ; ils se trouvent donc dans la nature sous forme d'esters. Ainsi les lipides du plasma sanguin ne contiennent pas d'acides gras libres. Au cours de l'ingestion de graisses, les acides gras sont libérés par des lipases. Ils sont cependant transformés à nouveau en esters au niveau de la paroi intestinale avant d'être déversés dans le courant circulatoire. Cependant, chez les végétaux, on peut trouver des acides gras libres. Nous ne voulons pas parler des acides gras de poids moléculaire faible (acide oxalique, citrique, etc.) qui, eux, sont très répandus dans le monde végétal, mais des acides gras (palmitique, stéarique, etc.) qui constituent les graisses neutres et qui peuvent apparaître à l'état libre, en particulier au cours de la germination des graines oléagineuses. Toutefois il s'agit alors d'un état physiologique essentiellement éphémère et des acides gras libres ne tardent pas à disparaître en se transformant dans les matières constitutives du protoplasme de la jeune plante et celle-ci en restera dépourvue dans tout le cours de son existence. Par contre, nous avons pu démontrer que des acides gras libres en quantité notable existent comme constituants normaux des bacilles tuberculeux.

De tout temps on a affirmé la présence d'acides gras non estérifiés dans les bacilles (KRESLING (10), GORIS (11)). Cependant il s'agissait de bacilles qui avaient été chauffés avant leur étude.

FROUIN et GUILLAUMIE (20) répétant les expériences sur des bacilles frais et non chauffés n'ont pas pu mettre en évidence des acides gras non estérifiés.

ANDERSON (21), travaillant avec des bacilles non chauffés et non desséchés, en a trouvé une quantité notable. Mais on pouvait lui objecter qu'il avait soumis son matériel à l'influence prolongée de l'alcool à la température du laboratoire, opération qui aurait pu libérer à la rigueur des acides gras par alcoolyse de fonctions esters.

Nous avons donc voulu trancher cette question si discutée. Nous nous sommes adressé à des bacilles non chauffés, non desséchés et à l'acétone, comme solvant des acides gras le moins brutal.

Nous avons récolté les cultures de 25 ballons sur milieu synthétique de Sauton de la souche bovine Vallée à l'âge de 4 semaines. L'opération a porté sur un poids total de 27,77 grammes de bacilles secs. Après filtration les bacilles frais ont été lavés abondamment à l'eau distillée de façon à enlever toute trace du milieu de culture. Nous les avons ensuite jetés encore frais dans 500 cm³ d'acétone, et après 24 heures de contact, nous avons filtré sur un entonnoir de Buchner. Les bacilles filtrés ont été remis dans 500 cm³ d'acétone et laissés de nouveau en contact pendant 24 heures. Nous avons répété ces opérations de façon à obtenir 8 extraits successifs par l'acétone, gardant chaque fois le délai de 24 heures de contact entre deux filtrations, sauf pour le 6^e extrait qui est resté en contact avec les bacilles pendant trois jours.

Une partie aliquote des extraits acétoniques ainsi obtenus a été titrée directement avec une solution de potasse alcoolique $\frac{N}{20}$, et le chiffre a été calculé en tenant compte du volume de l'extrait acétonique. Les valeurs obtenues sont réunies dans la 3^e colonne du tableau N° 7.

Nous avons évaporé les solutions acétoniques dans le vide à très basse température et sous l'azote. Le résidu fut repris par l'éther puis évaporé et desséché dans le vide dans un

(20) A. FROUIN et M. GUILLAUMIE, C. R. Soc. Biol. 1923, 87, 319.

(21) R. J. ANDERSON et E. CHARGAFF, *Journ. of. Biol. Chem.* 84, 703, 1929.

dessiccateur sur de l'anhydride phosphorique. Les poids des extraits totaux successifs sont réunis dans la deuxième colonne du tableau N° 7. Nous avons repris les extraits par l'éther, puis mis la solution étherée dans une boule à décanter et nous avons ajouté quelques gouttes d'acide chlorhydrique pour mettre en liberté tous les acides non estérifiés, qui pouvaient être à l'état de savons. Nous avons lavé ensuite la solution étherée à l'eau, de façon à éliminer toute trace d'acide chlorhydrique et nous avons vérifié, en examinant l'eau de lavage, l'élimination parfaite de tout acide hydrosoluble.

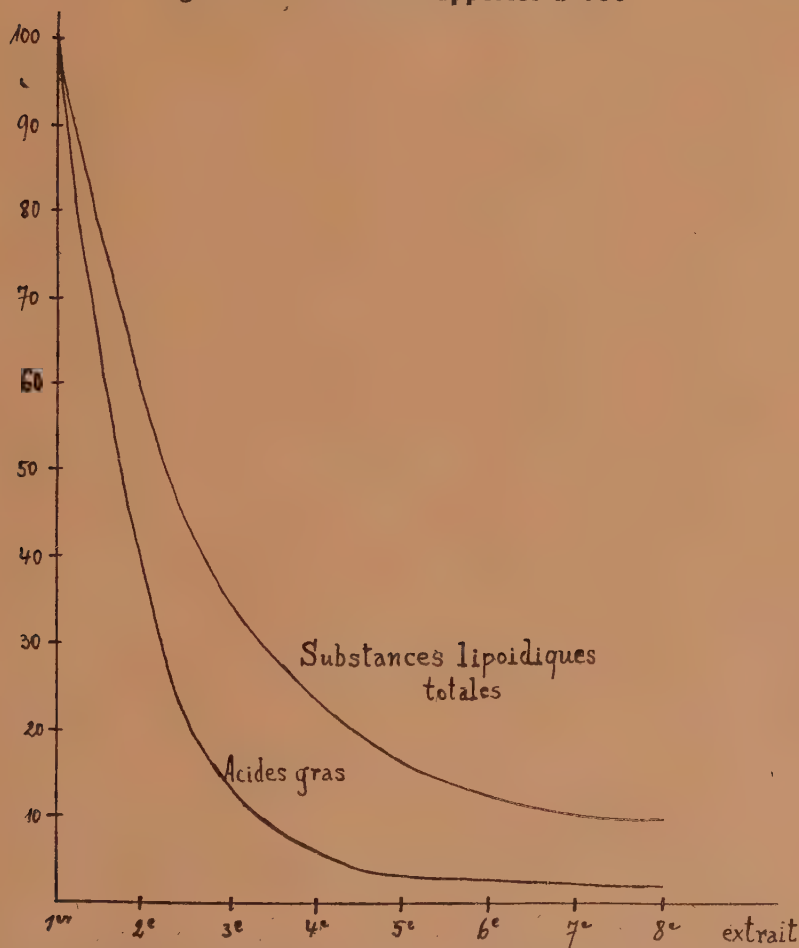
Tableau N° 7
Extraction des corps bacillaires à l'acétone

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Nombre d'extractions	Durée de contact des bacilles avec l'acétone	Poids de l'extrait acétonique en mg	Titration totale cm ³ KOH N/20	Titration des subst. lipoyd. cm ³ KOH N/20	Equivalent des subst. lipoydiques + ac. gras	II . 100	IV . 100
						775,1	22
1	24 heures	775,1	77,5	22,0	704	100	100
2	24 —	455,8	17,5	8,5	1040	58,8	38,7
3	24 —	268,2	9,0	2,6	2067	34,6	11,8
4	24 —	196,1	7,5	—	—	25,3	—
5	24 —	119,7	4,25	0,66	3600	15,6	3,0
6	3 × 24	151,3	4,25	0,74	4100	19,5	3,4
7	24 —	83,2	3,75	0,45	3680	10,7	2,0
8	24 —	73,1	3,75	0,52	(2800)	9,4	2,4

Pour titrer l'acidité de nos extraits, nous avons évaporé les solutions étherées et nous avons desséché le résidu jusqu'à poids constant. Enfin, celui-ci fut dissous dans de l'alcool et titré à chaud avec de la potasse alcoolique $\frac{N}{20}$ en présence de phtaléine du phénol comme indicateur. Les

résultats sont réunis dans la colonne IV du tableau N° 7. Le poids d'extrait total qui contient une normalité d'acide, est ce que nous appelons l'équivalent acide de cet extrait. Ces équivalents furent calculés pour les différents extraits (colonne V du tableau N° 7).

Graphique
de l'extraction des substances lipoidiques totales et des acides
gras non estérifiés rapportés à 100



Les lavages successifs à l'acétone aboutissent vite à l'épuisement total des substances solubles dans ce solvant. Le terme limite est déjà atteint après la 7^e extraction, car le

poids total de l'extrait obtenu par le traitement au delà de la 7^e extraction est minime. D'autre part, le poids de chacun des extraits successifs reste constant, ce qui prouve qu'on est arrivé à l'extraction de quelques substances très peu solubles dans l'acétone. Celui-ci entraîne d'abord des acides gras libres. Les graisses neutres, par contre, sont extraites plus lentement. En effet, l'équivalent d'acide des extraits augmente successivement, ce qui doit être expliqué à priori par une teneur plus forte en acides gras libres des premiers extraits.

Pour illustrer encore mieux l'extraction des acides gras libres plus rapide que celle des graisses neutres, nous avons calculé d'une part le poids des extraits successifs, en prenant pour le premier extrait la valeur 100 et d'autre part nous avons effectué le même calcul pour les volumes de potasse alcoolique $\frac{N}{20}$ nécessaires pour neutraliser l'acidité des extraits successifs. Ces valeurs sont réunies dans la colonne VI et VII du tableau, et représentées d'une façon graphique dans la figure N° 1.

Dans les extraits acétoniques obtenus à partir des bacilles tuberculeux, nous avons donc réussi à mettre en évidence la présence d'acides gras non estérifiés.

La proportion de ces acides gras dans les premiers extraits est plus considérable que dans les suivants, ce qui rend probable que ces acides gras sont particulièrement labiles au sein du corps bacillaire et constitue une preuve formelle contre l'hypothèse d'une mise en liberté éventuelle de ces acides au cours de l'extraction.

Substances lipoïdiques phosphorées

Nous avons envisagé jusqu'ici les glycérides et les stérides qui présentaient des particularités surtout du point de vue quantitatif, puis les acides gras ramifiés très caractéristiques du bacille tuberculeux et enfin les acides gras non estérifiés dont la présence était assez inattendue. Tous ces composés ne contenaient que du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Il existe un autre élément qui joue un grand rôle dans les lipides, c'est le phosphore.

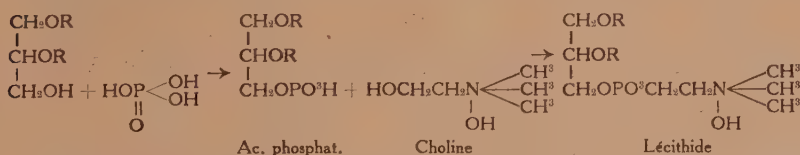
Nous verrons de nouveau que certains lipides phosphorés sont spécifiques du groupe des bacilles acidorésistants et différents de ceux des autres microorganismes. Il s'agit, comme on en trouve partout dans la nature, de composés du phosphore oxydé, dérivés de l'acide orthophosphorique. Mais dans le cas du bacille de Koch cet acide orthophosphorique, tout au moins en grande partie, est fixé dans un complexe plus simple que chez les lécithides les plus répandus dans la nature. En effet, les phosphatides du bacille tuberculeux sont constitués, pour une proportion importante, par des acides phosphatidiques*.

M. A. MACHEBŒUF, G. LÉVY et M. FAURE (22), dans une série de travaux, ont démontré la présence, dans le bacille tuberculeux, d'acides phosphatidiques, probablement sous forme de sels de magnésium. Ces travaux ont été confirmés récemment par BLOCH (23).

Dans le règne végétal de tels acides se trouvent sous forme de sels dans les feuilles, mais seulement en proportion relativement restreinte. Dans la majeure partie des graisses phosphorées des végétaux, l'acide phosphorique est lié non seulement au glycérol, mais aussi à une base azotée.

Or, dans le bacille tuberculeux, ces graisses phosphorées et aminées paraissent manquer, car on n'a jamais pu, avec certitude, mettre en évidence ni la choline ni l'aminoéthanol. Cependant, il existe encore des lipides phosphorés autres que les acides phosphatidiques et ces phosphatides

* Quand on remplace un acide gras dans les glycérides par l'acide phosphorique, on obtient un acide phosphatidique; on obtient un lécithide quand on estérifie l'acide phosphatidique avec de la choline ou de l'aminoéthanol.



(22) M. A. MACHEBŒUF, G. LÉVY et M. FAURE, C. R. Ac. Sc. 1935, 200, 1547. — 1937, 204, 1843. — M. A. MACHEBŒUF, *Revue de Pathologie Comparée*, 1936, 1266.

(23) K. BLOCH, *BIOCHEM. Ztschr.* 1936, 285, 372. — *Ztschr. f. Physiol. Chem.* 1936, 244, 1.

aussi sont particuliers au bacille de Koch. Toutefois ils ne sont pas sans analogie avec la phytine *, isolée par POSTERNAK (24) à partir de certains végétaux supérieurs. Dans le cas du bacille tuberculeux, il semble s'agir d'un acide inositomonophosphorique estérifié par des acides gras, en particulier par ces acides liquides ramifiés du type acide tuberculostéarique et phtioïque.

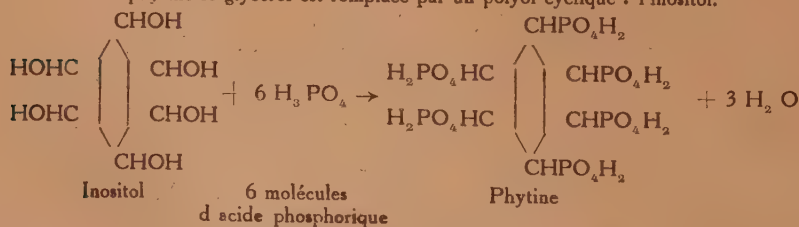
Ces combinaisons sont tout à fait particulières aux bacilles tuberculeux, et des substances de telle structure chimique n'ont été rencontrées nulle part ailleurs dans la nature.

Nous verrons dans la suite l'importance biologique de ces composés, aussi bien au point de vue de leur pouvoir haptène qu'à celui des réactions tissulaires qu'ils provoquent.

Cires

Dans la première partie de notre exposé, nous avons pu rapprocher des cires les substances lipoidiques du bacille tuberculeux, car leurs caractères, point de fusion et indice d'iode, sont parfaitement comparables. Nous venons de voir qu'il s'agissait seulement d'un rapprochement. Il y a, en effet, dans ces lipides bien des constituants plus ou moins caractéristiques des bacilles acidorésistants et du bacille tuberculeux en particulier. Mais y a-t-il réellement des cires dans les graisses du bacille de la tuberculose? Il est indiscutable qu'une forte proportion de substances lipoidiques du bacille de Koch est constituée par des composés « ressemblant aux cires » et c'est d'ailleurs cette fraction qui donne

* Dans la phytine le glycérol est remplacé par un polyol cyclique : l'inositol.



(24) POSTERNAK, C. R. Ac. Sc. 1903, 137, 1919, 169. — C. R. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève, 1920, 37.

le caractère cireux à l'ensemble des substances lipoïdiques. Toutefois il y avait lieu de se demander s'il n'existe qu'une « ressemblance » entre ces substances et les cires.

Tout d'abord qu'entendons-nous par ce dernier mot ? Au point de vue chimique, il désigne exclusivement des esters formés par des alcools gras supérieurs et des acides gras de poids moléculaire élevé. Très souvent cependant les cires contiennent aussi des alcools gras supérieurs libres qui ont d'ailleurs tous les caractères physiques de « cires », c'est-à-dire ceux de substances dures, à point de fusion relativement élevé, ayant un indice d'iode faible ou nul, ne contenant ni glycérol, ni phosphore, ni alcool cyclique.

Souvent dans la littérature ces cires sont à tort groupées sous le nom d'insaponifiable. C'est une définition par défaut. On saponifie une substance lipoïdique, on sépare du produit de saponification les acides gras ainsi que les substances solubles dans l'eau; ce qui reste est l'insaponifiable. Cette dénomination est particulièrement commode dans le cas où l'on n'est pas fixé sur la nature chimique de ce reste, car il peut, en effet, contenir aussi bien des alcools supérieurs que des cétones et des hydrocarbures.

Or, en ce qui concerne le bacille tuberculeux, on a réussi à mettre en évidence la présence d'alcools supérieurs probablement acycliques. En effet, STENDAL (25) a démontré la présence dans les cires du bacille tuberculeux d'un alcool supérieur, le phtioglycol, correspondant à la formule $C_{26}H_{52}O_3$.

ANDERSON (26), a isolé également un alcool supérieur contenant 35 (ou 36) atomes de carbone, le phtiocérol $C_{34}H_{67}(OH)_2OCH_3$, ayant deux fonctions alcool. Ces alcools sont certainement dans le corps bacillaire sous forme d'esters d'acides gras et forment ainsi, du point de vue chimique, de véritables cires.

La plus grande partie de ce qu'on appelle souvent les cires du bacille tuberculeux se trouve cependant être un

(25) N. STENDAL, C. R. Ac. Sc. 1934, 198, 1549.

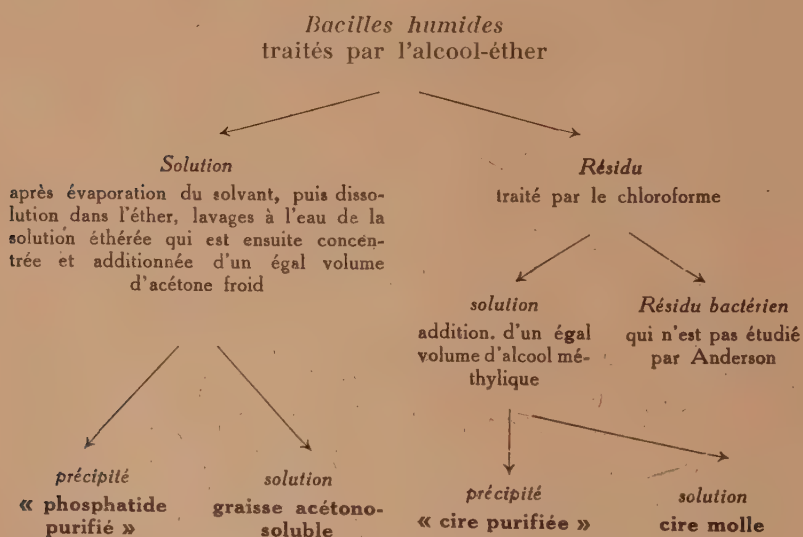
(26) F. A. STODOLA et R. J. ANDERSON, *Journ. of. Biol. Chem.* 1936, 114, 467.

insaponifiable de nature chimique encore discutée. D'après ANDERSON (27), ce corps possède, à côté d'une fonction alcool, une fonction acide, peut-être estérifiées l'une et l'autre de façon complexe dans la substance originelle.

Nous nous sommes rendu compte nous-même, au cours de l'étude de la fraction acidorésistante, de la grande difficulté que l'on rencontre à saponifier ces « cires » et de leur résistance envers des acides même concentrés.

Il est très regrettable qu'on soit si mal renseigné sur les propriétés chimiques de ces corps, car ce sont précisément eux qui impriment certaines de leurs caractéristiques aux bacilles acidorésistants et, parmi ceux-ci, aux bacilles pathogènes en particulier.

Avant d'examiner la répartition de ces cires dans les différentes souches de bacilles acidorésistants, nous devons dire quelques mots sur l'extraction des lipides et leur mode de fractionnement.



Nous avons mis les termes employés par ANDERSON « phosphatide purifié » et « cire purifiée » entre guillemets, précisément pour rappeler qu'il s'agit de pures dénominations et non de qualités chimiques. En effet, les tests de pureté employés par l'auteur sont insuffisants.

(27) R. J. ANDERSON, *Journ. of Biol. Chem.*, 1936, 114, 467.

Nous citerons seulement la technique d'ANDERSON (28). Elle consiste à traiter des bacilles vivants non chauffés avec un mélange à parties égales d'alcool et d'éther. L'extrait ainsi obtenu est fractionné à l'aide de l'acétone en *a*) graisses (solubles dans l'acétone) et *b*) phosphatides (insolubles dans l'acétone). ANDERSON traite ensuite les corps bactériens par le chloroforme et obtient les substances cireuses (fraction ressemblant aux cires). Celles-ci sont remarquablement caractéristiques du bacille tuberculeux, ainsi que nous le verrons par la suite.

Tableau N° 8

**Substances lipoidiques de différentes souches bactériennes
(Méthode d'Anderson)**

	Bacille humain (3)	Bacille bovin (28)	Bacille aviaire (28)	Bacille de la tortue (4)	Bacille du smegma (4)	Bacille acidophile (7)	Bacille diphthérique (29)
Graisses solub. dans l'acé- tone.	4,6 %	3,34 %	2,19 %	14,9 %	7,1 %	5,0 %	4,22 %
Graisses phos- phor. précipi- tées par l'acétone..	1,3 %	1,55 %	2,3 %	2,0 %	4,0 %	2,3 %	0,41 %
Substances ci- reuses ex- traitées au chloroforme	6,1 %	8,5 %	10,8 %	1,4 %	2,1 %	0,39 %	0,27 %
Lipides to- taux.	12,0 %	13,4 %	15,3 %	18,3 %	13,2 %	7,7 %	4,90 %

Comme nous le voyons, nous pouvons distinguer nettement, par leur teneur en cires, les bacilles acidorésistants d'une part, les bacilles non acidorésistants d'autre part. Parmi les acidorésistants, la fraction chloroformique paraît être plus élevée, à quelques exceptions près, chez les

(28) R. J. ANDERSON, *Physiol. Reviews*, 1932, 12, 166.

(29) E. CHARGAFF *Ztschr. f. Physiol. Chem.* 1931, 201, 191.

bacilles humains, bovins et aviaires que chez le bacille de la tortue et le saprophyte du smegma.

Par la méthode d'extraction que nous utilisons dans le laboratoire du professeur MACHEBŒUF cette différence entre bacilles acidorésistants et non acidorésistants devient encore plus nette.

MACHEBŒUF, DIERYCK et STOOP (30), se servant de l'appareil d'extraction Machebœuf-Fethke (31), font agir successivement de l'acétone, de l'éther, de l'alcool méthylique à froid, de l'alcool éthylique bouillant et du benzène bouillant sur les corps bacillaires. Les cires se trouvent dans la fraction étherée qui contient les cires proprement dites et dans la fraction « alcool éthylique bouillant » qui renferme une grande partie des « cires insaponifiables », lesquelles confèrent l'acidorésistance aux bacilles ainsi que nous l'exposons plus loin. Or, il est remarquable que ce sont précisément ces fractions qui sont les moins abondantes dans le bacille diphtérique par exemple (32).

Tableau N° 9

Fractions	Solvants ayant extrait les fractions	Poids des fractions rapportés à 100 grammes de bacilles secs	
		Bacille tuberculeux (souche Vallée)	Bacille diphtérique
1	Acétone froid.....	17,2	8,5
2	Ether froid.....	2,2	0,5
3	Alcool méthylique froid.....	3,3	3,3
4	Alcool éthylique bouillant.....	4,8	0,3
5	Benzène bouillant.....	0,3	0,1

(30) M. A. MACHEBŒUF, J. DIERYCK et R. STOOP, *Ann. Inst. Pasteur* 1935, 54, 71.

(31) M. A. MACHEBŒUF et N. FETHKE, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934, 16, 229.

(32) M. A. MACHEBŒUF et H. CASSAGNE, *C. R. Ac. Sc.* 1935, 200, 1988.

Résumé et conclusions du premier chapitre

Nous avons vu dans ce qui précède, que de nombreux points de la chimie des graisses du bacille tuberculeux ne sont pas encore suffisamment éclaircis. Il serait donc prématuré de conclure définitivement en ce qui concerne les particularités chimiques de ce germe. En effet, les quelques substances grasses qui nous paraissent de prime abord tout à fait spécifiques du bacille tuberculeux comme les acides phosphatidiques, les acides tuberculostéarique et phtioïque, quelques alcools supérieurs, ne sont point parfaitement connues. D'ailleurs, des substances analogues ont été retrouvées dans des êtres vivants autres que les bacilles tuberculeux. Par contre, au cours de notre étude, une particularité importante s'est révélée à deux reprises: en effet les graisses totales se rapprochent beaucoup par leur indice d'iode et leur point de fusion des autres cires animales et végétales. En outre tout le groupe des bacilles acidorésistants diffère précisément des autres microorganismes par la présence dans son extrait lipoidique de composés qui ressemblent aux cires à la fois par leurs caractères physiques et ce que nous savons de leur constitution chimique. C'est sur cet ensemble de faits et de particularités que nous nous sommes appuyé pour entreprendre les recherches plus particulièrement biologiques que nous allons maintenant exposer.

CHAPITRE II

HISTOLOGIE DES BACILLES TUBERCULEUX ET LEURS SUBSTANCES LIPOIDIQUES

Nous venons d'envisager dans le chapitre précédent les caractères chimiques des constituants cellulaires lipoidiques du bacille tuberculeux. Il faudrait maintenant relier ces données à la physiologie cellulaire et savoir avant tout si ces substances sont distribuées à l'intérieur de la cellule, en quelque sorte à l'état dissous dans le protoplasme cellulaire, ou si une partie au moins de ces lipides se trouve au contraire individualisée, en quelque sorte organisée dans la cellule. Naturellement le problème pathogénique de la tuberculose se trouvera lié à la physicochimie des lipides du bacille tuberculeux de façon tout à fait différente suivant que l'une ou l'autre de ces éventualités s'avèrera exacte.

En réalité, le problème est fort difficile à résoudre au point de vue expérimental et comme nous allons le voir, il n'a pas encore reçu une solution définitive.

ACIDORESISTANCE

Approfondissons avant tout les caractères tinctoriaux des bacilles tuberculeux, caractères qui sont encore d'ordre physico-chimique et qui nous aideront pour aborder l'étude des bacilles acidorésistants.

La caractéristique essentielle de la colorabilité des bacilles tuberculeux est l'acidorésistance. En fait cette caractéristique est commune à tout un groupe de bacilles, le groupe des bacilles acidorésistants.

L'acidorésistance consiste dans la propriété que possèdent ces bactéries de se colorer par les couleurs basiques et d'abandonner très difficilement ces couleurs sous l'action des acides.

Sur la nature et le mécanisme de l'acidorésistance on a beaucoup discuté. Il y a d'abord une série d'auteurs qui admettent que l'acidorésistance est une propriété du protoplasme dans sa totalité et que les différences d'acidorésistance sont uniquement dues à la dispersion plus ou moins grande des micelles protoplasmiques. Ce sont les défenseurs d'une théorie purement physique.

D'autres auteurs, par contre, ont attribué l'acidorésistance à la présence de composés chimiques bien définis. On a voulu faire jouer successivement un rôle au substratum protéido-cellulosique des bacilles (Hammerschlag), à une substance protéidique voisine de la chitine (Helbing, Ruppel), au squelette cellulosique (Auclair et Paris), finalement aux substances lipoïdiques et c'est cette dernière opinion qui a rassemblé le plus de suffrages, depuis les chercheurs de l'ère de Koch (Bienstock, Spina, Klebs) (33) jusqu'à nos jours.

Tout d'abord, il est certain que les bacilles acidorésistants possèdent en commun non seulement le caractère tinctorial qu'est l'acidorésistance, mais aussi une grande richesse en substances lipoïdiques présentant les mêmes particularités chimiques.

Examinons tout d'abord l'acidorésistance des graisses bacillaires isolées. Dans des expériences déjà anciennes, E. ROUX et A. BORREL (34) ont extrait les substances lipoïdiques, à partir des bacilles de Koch, à l'aide de xylol chaud, dans un appareil à épuisement continu, après les avoir

(33) A. CALMETTE. L'infection bacillaire et la tuberculose, 4^e édition, revue par A. Bocquet et L. Nègre, Masson et C^{ie}, édit. Paris 1936.

(34) E. ROUX et A. BORREL, *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, 2, (412).

libérées par une solution diluée d'acide chlorhydrique ou un chauffage au four à flamber, vers 140 à 150°. Ils ont constaté que les bacilles épuisés par le xylol bouillant perdent complètement leur propriété d'être acido-résistants, tandis que la substance grasse totale extraite possède nettement l'acidorésistance.

BULLOCH et MACLEOD (35) ont essayé de fractionner les substances lipoidiques obtenues à l'aide d'alcool méthyllique à chaud. Seule la partie insoluble dans l'alcool froid se colore au ZIEHL. Ces auteurs ont obtenu par saponification une poudre blanche, neigeuse, qu'ils considèrent comme un alcool supérieur, et à laquelle ils attribuent l'acidorésistance.

TAMURA (36) établit que l'acidorésistance est liée à la présence d'un alcool gras qu'il désigne du nom de Mykol.

Pour ANDERSON (37), l'acidorésistance appartient à l'insaponifiable des cires bacillaires. Cet insaponifiable serait une substance complexe qui posséderait une fonction acide, une fonction alcool et peut-être une fonction éther-oxyde.

Nous-même avons essayé d'extraire la substance acidorésistante des corps bacillaires, en nous servant de différents solvants. Nous nous sommes ensuite efforcés (38) de rassembler dans une seule fraction la substance acidorésistante, la séparant aussi complètement que possible des impuretés non acidorésistantes qui l'accompagnent sans faire intervenir l'action brutale des acides ou des alcalis concentrés.

Un fractionnement aussi systématique en contrôlant chaque étape par le test de l'acidorésistance n'avait pas été effectué avant nous; aussi il nous paraît utile de rapporter en détail la technique et les résultats de nos expériences.

(35) E. BULLOCH et I. J. R. MACLEOD, *Journ. Hyg.* 1904, 4, 1.

(36) TAMURA, *Ztschr. f. Physiol. Chem.* 1913, 87, 85.

(37) R. J. ANDERSON, *Journ. of. Biol. Chem.* 1929, 83, 505 et 85, 339.

(38) M. A. MACHEBŒUF, N. FETHKE et G. LÉVY, *Ann. Inst. Pasteur* 1934, 52, 295.

Fractionnement des substances acidorésistantes

Recherche d'acidorésistance

Pour déceler l'acidorésistance, nous avons dissous la substance dans le chloroforme, puis déposé une goutte de cette solution sur une lame de verre, évaporé le chloroforme, et obtenu ainsi la substance grasse en couche très mince étalée sur la lame.

Nous pensons nous être mis ainsi dans des conditions sensiblement comparables à celles d'un frottis bactérien, alors que certains auteurs s'étaient simplement contentés d'imprégner des bandes de papier filtre avec les substances à étudier.

Nous avons ensuite coloré, dans un bain à 80° pendant 20 minutes, par la fuschine phéniquée de ZIEHL, puis laissé les lames pendant une heure dans une solution à 25 % d'acide nitrique et le même temps dans l'alcool froid.

Fractionnement des substances lipoïdiques

Nous avons fait agir sur les bacilles tuberculeux d'abord de l'acétone froid, puis de l'alcool froid, et nous avons obtenu presque les deux tiers des lipides totaux des bacilles. Ces deux premières fractions abondantes ne possédaient pas trace d'acidorésistance. Nous avons fait agir ensuite de l'alcool chaud sur les corps bacillaires, et nous avons ainsi obtenu une masse cireuse, dure, blanche, qui représente moins de 20 % des substances lipoïdiques totales, donc moins de 5 % des corps bacillaires secs totaux.

Cette fraction possède à un haut degré la propriété de l'acidorésistance et la possède exclusivement, car les dernières fractions que l'on peut encore obtenir en extrayant les bacilles à l'éther et au chloroforme ne sont pas acidorésistantes.

Nous pouvons donc conclure que des différents lipides extraits à partir des bacilles tuberculeux successivement par l'acétone froid, l'alcool froid, l'alcool chaud, l'éther froid et le chloroforme froid, seuls les lipides cireux extraits par l'alcool chaud possèdent l'acidorésistance.

Mais ces substances cireuses ne sont pas acidorésistantes dans leur totalité; au sein de cette fraction on peut encore déceler des substances phosphorées et certaines substances cireuses qui n'ont pas cette propriété.

Pour effectuer la purification, nous avons traité ces substances par l'alcool chaud. Tout n'est pas dissous; il reste un résidu * qui, séparé du liquide, n'est pas acidorésistant. La solution alcoolique chaude, par refroidissement, laisse déposer des substances acidorésistantes, tandis qu'il reste une solution alcoolique de substances qui n'ont pas cette propriété.

Cette première purification élimine plus d'un tiers de substances ne possédant pas l'acidorésistance. La fraction purifiée contient des quantités encore assez notables d'impuretés phosphorées. Par dissolutions dans le benzène et précipitations par l'alcool, répétées trois fois, nous arrivons à réduire la teneur en phosphore jusqu'à 0,15 %.

Mais, on aboutit encore à une meilleure élimination des impuretés phosphorées en épuisant la fraction purifiée par l'acétone chaud. La substance acidorésistante dissoute dans ces conditions, se dépose par refroidissement de l'acétone. On obtient ainsi une poudre cireuse, dure, blanche, fondant à 57-58° en donnant une huile transparente absolument incolore, exempte d'azote et de phosphore. Cette substance acidorésistante est très soluble dans le benzène, le chloroforme, l'éther de pétrole, assez soluble dans l'alcool chaud et l'acétone chaud, très faiblement dans l'alcool froid, et reste presque insoluble dans l'acétone froid. C'est une substance complexe car le poids moléculaire est assez élevé; par la méthode ébulliométrique de SWIETOSLAWSKI en solution benzénique, nous avons, en deux essais, obtenu des poids moléculaires de 1070 et 1060.

* Ce résidu a été entraîné par les autres substances solubles dans l'alcool.

Nous avons vu qu'il faut utiliser de l'alcool chaud pour obtenir la substance acidorésistante parce que celle-ci est peu soluble dans l'acétone et l'alcool froid. Cependant les faits sont plus complexes. En effet, MACHEBŒUF, DIERYCK et STOOP (40 a) ont constaté que l'alcool chaud n'a pas seulement une simple action dissolvante. En effet, si on traite par l'éther froid des corps bacillaires déshydratés et épuisés au préalable par l'acétone froid dans l'appareil à extraction continue dans le vide (40b), on constate que l'éther ne dissout pas trace de substances acidorésistantes. Pourtant ces substances sont bien solubles dans l'éther froid. Il faudrait donc admettre que les substances acidorésistantes sont liées, dans le corps bacillaire, à d'autres

Tableau N° 10
Extraction fractionnée des substances lipoidiques
du bacille tuberculeux

Fractions	Solvants	Poids de la fraction	Teneur en phosphore %	Pouvoir haptène	Acidorésistance
I	Acétone froid.	17,20	0	0	0
II	Ether froid.....	2,20	0	0	0
III	Alcool méthylique froid	2,05	1,48	très intense	0
	Alc. éthylique bouillant	(4,82)			
IV	Fraction soluble dans l'alcool froid.	2,35	0,88	assez fort	0
V	Fraction insoluble dans l'alcool froid.....	2,47	0,83		
VI	Benzène bouillant. ...	0,34	0,54	0	+
	Total des substances lipoidiques % de bacilles desséchés. ...	26,61			

(40 a) M. A. MACHEBŒUF, J. DIERYCK et R. STOOP, Ann. Inst. Pasteur 1935, 54, 71.

(40 b) M. A. MACHEBŒUF et N. FETHKE, Bull. Soc. Chim. Biol. 1934, 16, 229.

constituants et que l'alcool chaud libère en réalité ces liaisons *. Quant à la nature de celles-ci, on ne peut encore rien dire de précis. Remarquons qu'il s'agit probablement de liaisons de même nature que celles qui existent entre les phosphatides et certains constituants bacillaires de nature inconnue.

Les chiffres relatés dans le tableau N° 10 illustrent bien les faits ; ils indiquent aussi que, parmi toutes ces fractions, il n'y en a que deux qui contiennent des substances acidorésistantes et la plus grande partie en est contenue dans la fraction V qui ne représente qu'environ 10 % des lipides totaux. Pourtant les autres fractions et en particulier les fractions II et IV sont des cires et même la fraction I en contient, mais ces cires ne sont pas acidorésistantes.

Les substances acidorésistantes constituent donc une petite partie seulement des substances lipoïdiques et même des cires du bacille tuberculeux. Elles se trouvent, au sein du bacille de Koch, combinées à d'autres substances sous forme de complexes non dissociés par l'acétone, ni par l'alcool froid, mais seulement par l'alcool bouillant.

Il est ainsi certain qu'il y a dans le bacille tuberculeux une ou plusieurs substances de nature lipoïdique appartenant aux cires, mais ne représentant qu'une partie de celles-ci. Cependant, il reste encore à prouver que l'acidorésistance du corps bacillaire est réellement due à cette substance.

A priori, le parallélisme entre la présence de certaines graisses acidorésistantes et l'acidorésistance est frappant mais il peut être encore une pure coïncidence. La première question qui se pose est de savoir si l'acidorésistance est une propriété aussi spécifique de ces cires bacillaires que des bacilles acidorésistants eux-mêmes, c'est-à-dire si dans des microorganismes non acidorésistants nous ne trouvons pas des constituants qui soient quand même acidorésistants.

* Il est probable qu'il s'agit de cénapses lipidoprotéïdiques que détruirait l'alcool chaud en dénaturant les protéïdes (Voir M. A. MACHEBŒUF, L'état des lipides de la matière vivante, les cénapses et leur importance biologique, 1 vol. Paris, 1937, Hermann et Cie, éditeurs).

Plusieurs auteurs ont cru pouvoir démontrer que l'acidorésistance existe aussi pour des constituants communs d'organismes tout aussi communs. Ainsi on a décrit tour à tour une acidorésistance de lécithides, d'acides gras, etc. En réalité, avec une technique convenable comme celle que nous avons décrite, on arrive facilement à montrer qu'aucune de ces substances n'est réellement acidorésistante.

Nous croyons donc qu'un premier point reste établi : l'acidorésistance est non seulement une propriété spécifique des bacilles acidorésistants, mais aussi de certaines substances contenues dans la fraction cireuse de ces bacilles.

Par contre une deuxième objection peut encore se poser. Il faudrait, en effet, savoir si réellement toute l'acidorésistance du corps bacillaire est due uniquement aux substances acidorésistantes examinées ci-dessus.

Etant donné qu'il s'agit ici d'une propriété liée à une matière, on doit pouvoir, en séparant la matière, séparer cette propriété. Or, nous pouvons en effet constater qu'après avoir enlevé la substance acidorésistante, les bacilles ont perdu leur acidorésistance. Il y a donc parallélisme parfait entre l'acidorésistance du bacille et l'acidorésistance de la fraction considérée.

Certains auteurs ont cru pouvoir affirmer que les bacilles retiennent leur propriété après extraction complète par les solvants des lipides. Nous avons vu que pour extraire la substance acidorésistante on doit traiter les bacilles par l'alcool bouillant, ou par l'acide chlorhydrique dilué; somme toute, la substance acidorésistance est difficilement extractible et on peut admettre à priori que les auteurs en question n'ont pas suffisamment poussé l'épuisement des corps bacillaires.

Nous croyons donc que l'acidorésistance disparaît réellement après extraction des cires acidorésistantes.

Il nous reste encore à répondre à une troisième objection possible. En effet, pour prouver que l'acidorésistance des corps bacillaires est due réellement à la substance acidorésistante, il faut encore que l'acidorésistance soit réellement liée uniquement à la présence de cette substance. Est-il donc

absolument nécessaire d'extraire cette substance pour détruire l'acidorésistance des corps bacillaires ?

Cette question a toujours été beaucoup discutée. Déjà KOCH (41) a observé que la désintégration mécanique prive les bacilles de leurs caractères tinctoriaux. Il a trituré des bacilles dans un mortier d'agate jusqu'à disparition complète de toute structure morphologique. Parallèlement avec la perte de la structure histologique, le matériel a perdu aussi son acidorésistance.

Ces résultats ont été fréquemment confirmés. Ainsi BENIANS et SHERMAN (42) ont trouvé qu'il suffit de frotter des bacilles entre des plaques de verre pour obtenir un frottis non acidorésistant. Il est facile de vérifier ces constatations. Ainsi les bacilles moulus dans un broyeur à boules ne sont pas acidorésistants (43).

Nous voyons donc qu'il n'est pas absolument nécessaire d'extraire les substances acidorésistantes pour détruire l'acidorésistance, puisque certaines interventions mécaniques suffisent pour faire disparaître cette propriété tinctoriale.

Comment interpréter ce résultat ? Devons-nous rejeter notre conclusion primitive quant au rôle joué par la substance acidorésistante dans l'acidorésistance des bacilles ? En réalité, une autre explication aussi est possible, mais pour faciliter la compréhension de cet exposé, il convient de décrire quelques caractères tinctoriaux autres que l'acidorésistance.

(41) R. KOCH, *Deutsch. Med. Woch.* 1897, 23, 209.

(42) T. H. C. BENIANS, *Journ. Pathol. a. Bact.* 1912-13 17, 199.
— H. SHERMAN, *Journ. Inf. Dis.* 1913, 12, 249.

(43) H. GIDEON WELLS, ESMOND R. LONG, *The Chemistry of Tuberculosis*, Baltimore, 1932.

ORGANISATION DES BACILLES

Ces propriétés tinctoriales nous donneront peut-être quelques éclaircissements sur l'état d'organisation des substances lipoidiques.

Une méthode très ancienne est celle de la coloration des granulations de MUCH. Si on traite les bacilles tuberculeux suivant la méthode de GRAM, on n'obtient pas une coloration uniforme ; de petites zones sphériques colorées en violet foncé se détachent du reste du protoplasme incolore.

Demandons-nous donc à quelles substances correspondent ces corpuscules de Much.

Pour répondre à cette question, nous pouvons nous appuyer sur les théories qui ont été émises pour la coloration de Gram. L'opinion la plus universellement adoptée est que ce sont des substances lipoidiques (acides gras, cires complexes, cénapses lipoprotéidiques, etc.) qui absorbent le colorant ; tout solvant de celui-ci le déplace chez les bacilles Gram négatifs plus facilement que chez les bacilles Gram positifs. Il s'agit donc essentiellement, dans ces réactions, de forces physicochimiques, sans spécificité chimique. En effet, le degré de dispersion paraît toujours intervenir ; moins la dispersion est grande, plus la réaction est positive.

Par analogie, nous pouvons admettre que les corpuscules de Much sont probablement constitués, eux aussi, par des substances lipoidiques.

Il est pourtant remarquable que des tentatives répétées de coloration des bacilles tuberculeux avec les colorants classiques des graisses comme l'acide osmique, le soudan III, l'écarlate R ont échoué.

Cependant ces colorations sont très délicates et le mode de fixation intervient certainement, pouvant détruire une structure qui pourrait être décelée par un traitement approprié. De toutes façons nous pouvons affirmer que dans leur totalité les bacilles tuberculeux ne présentent pas les colorations des graisses.

En opposition avec ces résultats négatifs, HOLLANDE et

CRÉMIEUX (44) ont réussi à colorer les bacilles tuberculeux en coloration vitale avec le bleu de Nil en ajoutant au milieu de culture des bacilles vivants, un égal volume d'une solution de Bleu de Nil à 0,2 %. Après avoir fixé les frottis à la chaleur, ils ont obtenu au sein du protoplasme presque incolore des grains colorés en bleu foncé. Par contre, la coloration de ces grains était impossible à obtenir après fixation à l'alcool-éther et traitement avec l'acétone ou le xylol. Dans ce cas, le protoplasme du bacille n'était coloré que très légèrement en bleu pâle.

De ces expériences ces auteurs concluent que le bleu de Nil colore des grains analogues aux granulations de Much. Le bleu de Nil étant un colorant des graisses, il est fort probable qu'il s'agit de la coloration de substances lipoïdiques. Cette opinion est corroborée par le fait que la coloration est impossible à obtenir après traitement par les solvants des graisses. Enfin, la coloration en bleu et non en rouge indiquerait que la matière colorée est légèrement acide. Donc, d'après ces auteurs, les granulations de Much seraient constituées par des substances lipoïdiques à réaction acide et ces granulations représenteraient en quelque sorte des substances de réserve.

Essayons maintenant de tracer un parallèle entre les propriétés physico-chimiques d'extractibilité particulière des graisses et les caractères histo-physiologiques des différentes fractions lipidiques.

Les graisses facilement extractibles que l'on dissout en particulier en traitant les bacilles par l'acétone puis par l'éther froid, pourraient facilement constituer quelque chose de correspondant à ce que nous avons l'habitude d'appeler, dans le cas des organismes supérieurs, des graisses de réserve.

En effet, cette fraction est constituée en partie par des glycérides comme les graisses de réserve. En outre, c'est précisément cette fraction qui subit les variations quantitatives les plus importantes suivant les conditions physiologiques de nutrition (p. 19) exactement comme les graisses

(44) HOLLANDE et CRÉMIEUX, C. R. Soc. Biol. 1928, 98, 1379, 1529.

de réserve. Ces considérations donnent le point de vue physiologique.

Quant à la morphologie cellulaire, il se peut que la fraction facilement extractible représente une phase lipidique séparée (par exemple émulsion de graisses neutres stabilisée par des savons) formant ainsi des inclusions que certaines méthodes de coloration permettent de mettre en évidence. (Corpuscules de Much, travaux de Hollande).

Contrairement à ces graisses de réserve, les substances lipoïdiques phosphorées représenteraient des graisses de constitution. Pour cette façon de voir, nous pouvons invoquer l'analogie avec les autres représentants des substances lipoïdiques phosphorées faisant toujours partie du protoplasme. Au point de vue physico-chimique, ces composés sont inextractibles par l'éther à froid malgré leur parfaite solubilité dans ce solvant. Il faut un traitement prolongé à l'alcool méthylique à froid pour les libérer comme nous l'avons vu précédemment (tableau N° 10, p. 48).

La place que nous devons donner aux cires est plus difficile à trouver. En effet, en présence de ces substances éminemment insolubles dans l'eau, peu fusibles, de grande stabilité, l'idée vient à l'esprit qu'elles doivent former nécessairement une phase cireuse particulière dans les bacilles tuberculeux. D'ailleurs, déjà EHRLICH a émis une hypothèse de ce genre en expliquant l'acidorésistance par l'existence d'une coque cireuse à la surface des bacilles.

Dans cette hypothèse, on fait un rapprochement entre les cires du bacille tuberculeux et certaines cires des plantes supérieures. Dans les deux cas, il s'agirait de substances de protection recouvrant la surface des « organes ».

Cependant, les cires des bacilles tuberculeux sont éminemment solubles dans l'éther. Si elles formaient donc simplement une couche cireuse superficielle, elles devraient être facilement extractibles par l'éther froid, mais comme nous l'avons vu, ce n'est pas le cas et il ne faut pas seulement un traitement à l'alcool *froid* comme pour les phosphatides, mais à l'alcool *bouillant* pour aboutir à leur dissolution à partir des corps bacillaires. Il faut donc admettre qu'elles sont liées d'une façon ou d'une autre à d'autres

constituants cellulaires, et plus fortement que les phosphatides.

Par ce fait même, nous avons éliminé l'idée, par ailleurs assez simpliste, consistant à admettre l'existence dans les bacilles tuberculeux d'une organisation de surface comparable à celle existant chez des êtres supérieurs.

Mais la question de la structure peut se poser d'une autre façon lorsqu'il s'agit simplement du protoplasme d'un microorganisme. Là nous devons être à la limite du monde moléculaire et du monde des organisations vivantes à proprement parler. Et nous devons chercher tout au contraire les raisons physico-chimiques qui peuvent aboutir éventuellement à ces organisations. Ces raisons physico-chimiques peuvent résulter de liaisons par valence résiduelle ou valence principale, de polarisations moléculaires.

Revenons donc sur l'exemple offert par les cires du bacille tuberculeux. L'existence d'une coque cirograisseuse a été réfutée, mais certains faits tendent à prouver qu'une certaine organisation de ces cires existe quand même à l'intérieur du protoplasme bacillaire.

En particulier, il serait difficile à expliquer pourquoi les influences mécaniques peuvent faire disparaître l'acidorésistance si l'on admettait que les substances cireuses acidorésistantes sont simplement dissoutes d'une façon homogène à l'intérieur du protoplasme. Si l'on admet, par contre, que ces cires occupent dans le protoplasme normal une situation superficielle au sein des micelles protoplasmiques, tandis que d'autres constituants comme des protéïdes en occupent des couches plus profondes, il est possible d'expliquer la disparition de l'acidorésistance par une sorte de renversement de cette situation mutuelle, pouvant résulter d'une dépolarisation des micelles. Nous avons ainsi transporté simplement le problème des organisations à une échelle plus réduite. Et ce problème a montré par ce fait même son aspect physico-chimique. Naturellement nous n'avons encore aucune preuve précise en faveur de cette conception. Nous l'avons montré plutôt comme une possibilité pouvant d'ailleurs avoir une certaine généralité.

Finalement nous avons ainsi rendu très probable l'hypo-

thèse que les caractères tinctoriaux essentiels des bacilles acidorésistants sont dûs à la fraction cireuse de leurs substances lipoïdiques. Un premier caractère déjà de teinture biologique nous fut ainsi révélé dans son aspect chimique. Il est aussi certain que l'acidorésistance est l'une des manifestations du caractère général de résistance et d'indestructibilité des bacilles tuberculeux et certaines substances cireuses paraissent en être le support.

Faisons un pas en avant et entrons dans les domaines histopathologique et physiopathologique afin de voir si nous n'allons pas y retrouver certains caractères pouvant s'expliquer par la constitution particulière de quelques graisses bacillaires.

CHAPITRE III

RAPPORTS ENTRE LES GRAISSES DU BACILLE TUBERCULEUX ET LES LÉSIONS DÉTERMINÉES PAR CE BACILLE

Des réactions cellulaires d'un type particulier caractérisent l'infection tuberculeuse. Alors que l'organisme se défend contre la plupart des germes pathogènes par la phagocytose et la digestion intracellulaire, tout au plus suivies d'une phase macrophagique, il réagit à l'invasion du bacille de Koch par une évolution histologique très complexe. Celle-ci s'explique d'ailleurs aisément par les caractères de l'agent pathogène, en particulier par sa stabilité et la résistance extraordinaire qu'il présente à la lyse et aux autres processus destructeurs.

Décrivons tout d'abord, d'après les notions classiques (46), les réactions histologiques qui suivent la pénétration des bacilles tuberculeux dans l'organisme vivant : dans une première période, il y a un afflux de polynucléaires qui englobent les bacilles, mais qui sont incapables de les détruire. Aussi, dans une deuxième période, de grands mononucléaires affluent et phagocytent les polynucléaires avec les bacilles ingérés. Mais des quantités plus ou moins grandes de bacilles ont encore échappé à l'englobement ou sont devenus libres par destruction des cellules qui les avaient englobés. De nouveaux macrophages les entourent et se fusionnent, formant des cellules géantes. D'autres macrophages se trouvant plus à la périphérie se transforment

(46) A. BORREL, *Annales Inst. Pasteur*, 1893, 7, 593 ; 1894, 8, 65.

en cellules épithélioïdes; le follicule tuberculeux est ainsi constitué. Mais la lésion n'est pas encore arrivé à son stade ultime. Au sein même du follicule, les bacilles tuent les cellules, mais la résorption ne se fait pas, probablement parce que l'autolyse fait défaut ; il y a une modification tissulaire sur place, appelée caséification. Enfin, très lentement, le centre du caséum se ramollit, au moment où de nouveaux phagocytes affluent.

On peut ainsi distinguer plusieurs phases dans les réactions cellulaires au cours de l'infection tuberculeuse. Afflux de polynucléaires — englobement; afflux de macrophages — englobement — formation de cellules géantes; caséification. Nous allons voir successivement les différentes étapes en considérant plus particulièrement dans chaque cas ce qui peut être particulier aux bacilles tuberculeux entiers puis les faits qui pourraient être mis sur le compte des substances lipoïdiques de ceux-ci.

PHAGOCYTOSE

Réactions polynucléaires

Lorsqu'on introduit des bacilles tuberculeux dans l'organisme, il y a un afflux de polynucléaires comme après introduction de n'importe quel corps étranger. Les polynucléaires englobent facilement les bacilles introduits. A ce point de vue nous pouvons remarquer seulement un fait notable : contrairement à d'autres microorganismes dont l'englobement paraît être d'autant plus difficile qu'ils sont plus virulents (Gonococque, bacille du charbon, etc.), pour les bacilles tuberculeux il ne paraît y avoir aucune relation entre la facilité avec laquelle l'englobement se produit et

le degré de virulence. Ce fait tend à exclure un mécanisme de la virulence du genre agressique *.

Un fait est donc bien établi, c'est que le pouvoir pathogène des bacilles tuberculeux ne paraît pas être lié, à proprement parler, au processus d'englobement. Cependant les bacilles, quel que soit d'ailleurs leur degré de virulence, ne sont quand même pas englobés aussi facilement par les leucocytes que n'importe quel corpuscule inerte. Nous en avons la preuve lorsque nous observons la phagocytose des bacilles dans des tissus relativement peu vascularisés et par conséquent peu riches en polynucléaires, ayant traversé les parois des capillaires. Ainsi par exemple les bacilles introduits dans le tissu sous-cutané en quantité relativement grande peuvent échapper à l'englobement par les polynucléaires qui toutefois sont présents, naturellement en nombre moindre que dans le cas de tissus fortement vascularisés comme le poumon ou le péritoine. La résistance, toutefois relativement faible, que les bacilles paraissent ainsi opposer à l'englobement par les leucocytes, pourrait être mise sur le compte de certaines substances lipoïdiques bacillaires et en particulier des acides gras libres.

* Une virulence liée à la production de substances permettant au microorganisme d'éviter l'englobement par les leucocytes peut être appelée : virulence à mécanisme agressique, puisque nous avons l'habitude d'appeler agressines les substances excrétées par les microorganismes pathogènes, empêchant par une action à distance l'englobement de ces derniers par les leucocytes.

Action des acides gras non estérifiés

Nous-même avons contribué à l'éclaircissement de ce problème en vérifiant que des traces d'acides gras libres de poids moléculaire élevé suffisent pour diminuer sensiblement le pouvoir englobant des leucocytes vis-à-vis de particules inertes. Nous avons donné la préférence à des expériences *in vitro* et non à des expériences *in vivo*, car la multiplicité des facteurs entrant en jeu rend difficiles les conclusions. Nous avons choisi des particules inertes au lieu des bactéries, la toxicité et les produits du métabolisme de celles-ci pouvant nuire à la lecture des résultats.

Nous avons adopté la technique de HAMBURGER (47) : leucocytes du sang de cheval mis en présence de grains d'amidon de riz, le milieu étant constitué par une émulsion au millième des substances lipoidiques, en solution physiologique, tamponnée à pH 7,3 (tampon de Sørensen) et additionnée de trois gouttes de sérum frais de cheval.

Nous avons d'abord laissé agir pendant une demi-heure l'émulsion des substances lipoidiques sur les leucocytes, puis nous avons ajouté les grains d'amidon de riz. Nous avons porté le tout à l'étuve à 37° pendant des temps variables (10, 20, 30 minutes), et nous avons compté au microscope le nombre total de leucocytes et ceux ayant englobé des grains d'amidon de riz. Le rapport des deux nombres trouvés multiplié par cent donne le degré de phagocytose.

Nous avons préparé des émulsions a) de substances lipoidiques provenant de l'extraction à l'acétone des corps bacillaires, b) d'huile d'olive neutre, c) d'acide oléique. Nous avons pesé dans un tube 10 mmgr. de la substance lipoidique. Nous l'avons dissoute dans 1 cm³ d'acétone et ajouté 9 cm³ d'eau goutte à goutte de façon à obtenir une émulsion.

(47) HAMBURGER, *Physikalisch-chemische Untersuchungen über Phagocytose*, Wiesbaden 1912.

sion; nous avons ensuite évaporé le liquide dans le vide, au tiers du volume, pour chasser tout l'acétone. Nous avons complété avec de l'eau distillée et ajouté le tampon de Sørensen : phosphate monosodique et phosphate bipotassique pour arriver à un pH de 7,3. Nous avons finalement additionné cette émulsion d'une solution à 3,5 % de chlorure de sodium de façon à obtenir une solution physiologique et complété au volume de 10 cm³. La même suite des opérations a été observée pour la préparation du témoin. Opérant dans tous les cas de façon rigoureusement identique, nous avons comparé le degré de phagocytose des grains de riz en présence de ces diverses substances lipoïdiques. Dans le tableau ci-après (tableau N° 11), nous réunissons les résultats obtenus.

Tableau n° 11

$$\text{Degré de phagocytose} = \frac{\text{leucocytes ayant englobés}}{\text{leucocytes totaux}} \cdot 100$$

	D.rée de phagocytose		
	10 '	20 '	30 '
Substances lipoïdiques du bacille tuberculeux			
{ 1 ^{re} extrait acétoniq.		5 %	40 %
{ 3 ^e extrait acétoniq.		41 %	43 %
Huile d'olive neutre.	20 %	28 %	33 %
Acide oléique.	0 %	4 %	Agglom. notable. Pas d'englob. pour les phagocytes libres.
Témoin.	20 %	25 %	40 %

Nous voyons par ces chiffres que dans chaque série, la phagocytose progresse avec le temps. Dans ces émulsions d'extraits acétoniques du bacille tuberculeux, on constate un degré de phagocytose très inférieur à celui du témoin. De ces deux fractions, la première, qui possède une

teneur en acides gras libres plus élevée, montre un degré d'englobement plus faible. Dans la solution contenant de l'acide oléique, la phagocytose ne se fait pas, tandis que dans l'émulsion d'huile d'olive neutre, la phagocytose atteint presque celle du témoin.

Il est ainsi fort probable que ce sont précisément, dans les extraits acétoniques des corps bacillaires, les acides gras libres qui empêchent la phagocytose. Il est aussi légitime d'admettre que ces mêmes acides libres agissent de même lorsqu'ils sont à l'état dissous dans le protoplasme bacillaire.

Cette action des acides gras non estérifiés est assez inattendue. La phagocytose est influencée par des forces de surface et en particulier par celle de la tension superficielle. En effet, toute raison tendant à diminuer la tension superficielle doit, par ce fait même, augmenter le degré de phagocytose, puisque la confluence de deux gouttelettes de liquide doit être d'autant plus facile que la tension interfaciale au contact des deux liquides en question est plus basse. Les acides gras devraient avoir précisément l'action inverse puisqu'ils diminuent fortement la tension superficielle.

Il faut donc admettre que les acides gras libres agissent d'une autre façon sur les leucocytes. On pourrait penser, de prime abord, qu'ils interviennent en acidifiant le milieu. Nous savons, en effet, que des changements de pH aussi bien dans l'un que dans l'autre cas abaissent fortement le degré d'englobement. Mais ces acides gras supérieurs forment des solutions colloïdales et leur fraction dissoute, à proprement parler, ne constitue qu'une proportion infime de leur concentration totale. Enfin l'influence des acides gras sur la phagocytose reste la même lorsqu'on prend la précaution de bien neutraliser le milieu et de le tamponner.

Ce n'est donc ni la tension superficielle, ni le pH qui interviennent; il nous semble plutôt qu'il s'agit ici d'une action spécifique, ou des acides gras non dissociés HOOCR , ou de l'anion $-\text{OOCR}$, sur la vitalité des leucocytes. Somme toute nous pensons que les acides gras interviennent par leur action toxique sur les leucocytes.

Mécanisme possible de la dégénérescence des polynucléaires

Après avoir étudié le processus d'englobement des bacilles tuberculeux par les polynucléaires, examinons maintenant le sort dévolu au bacille englobé et au leucocyte ayant phagocyté. Nous avons déjà vu que ce dernier dégénère et meurt. Il se pose donc maintenant le problème de l'action du bacille sur le leucocyte qui l'a englobé.

Le polynucléaire est-il intoxiqué avant l'englobement, la dégénérescence de son protoplasme ne se produisant qu'à retardement ou est-ce au contraire le fait qu'il a englobé le bacille tuberculeux, qui cause sa mort ? Ou s'agit-il tout simplement d'une auto-intoxication par déviation de son propre métabolisme par suite de la présence d'un organisme étranger vivant au sein de son protoplasme ?

Nous ne saurions donner une réponse décisive à ces questions. A en juger d'après le temps et l'étendue de cette déchéance nous croyons cependant pouvoir affirmer qu'il ne s'agit pas ici d'une action comparable à l'action des leucocydines du staphylococque. Les polynucléaires ne sont pas tués en masse de façon à former des agglomérations de cellules mortifiées se révélant sous forme de pus.

Il ne s'agit pas non plus, nous semble-t-il, d'action à allure extrêmement lente, au cours de laquelle l'adaptation réciproque des métabolismes du leucocyte et du bacille tuberculeux, permettrait une symbiose plus ou moins prolongée, car celle-ci n'a pas été observée à l'intérieur des polynucléaires.

Il paraît plutôt que nous avons ici à faire à une action toxique qui ne devient prononcée qu'après l'englobement, sans pouvoir nous décider pour une action toxique directe ou une action provenant de l'incompatibilité des produits du métabolisme des deux organismes. Cependant il n'est pas impossible que ce soient les acides gras libres qui causent la mort des polynucléaires. En effet, certains faits plaident en faveur de cette conception.

Ainsi, M. A. MACHEBŒUF, J. DIERYCK et Mme Blanche DIERYCK (48), ont montré que les bacilles tuberculeux tués par la chaleur, se comportent d'une façon sensiblement différente, vis-à-vis des leucocytes, avant et après l'extraction acétonique. La phagocytose des bacilles fut suivie *in vivo*, chez le cobaye, dans l'exsudat péritonéal dont on faisait des frottis successifs qui furent fixés puis colorés. Les leucocytes qui avaient englobé des bacilles tués par la chaleur, mais non dégraissés, ont présenté des signes manifestes de dégénérescence (chromatolyse, vacuolisation et éclatement du protoplasme), tandis que ceux qui avaient englobé des bacilles tués puis dégraissés à l'acétone froid et à l'éther froid, n'ont présenté aucun signe de souffrance.

Naturellement cette dernière expérience n'apporte pas à priori de preuve décisive du rôle des acides gras, puisque l'acétone a extrait d'autres constituants bacillaires que les acides gras libres. Mais il est certain que l'acétone extrait, avant tout, ces derniers constituants (Voir mes expériences personnelles, page 30). Ainsi il n'est pas impossible que la différence de comportement des bacilles vis-à-vis des leucocytes soit due précisément à l'enlèvement des acides gras libres.

Nous pouvons donc admettre que les acides gras non estérifiés contenus dans le bacille tuberculeux peuvent, non seulement entraver la phagocytose, mais aussi exercer une action nocive sur les leucocytes ayant déjà englobé des bacilles.

Réactions mononucléaires

Poursuivons maintenant l'étude des réactions cellulaires et demandons-nous en particulier ce que deviennent les bacilles après leur englobement par les polynucléaires.

En aucun cas lorsqu'il s'agit de bacilles tuberculeux, cet englobement ne paraît aboutir à son but : la mort et la digestion intracellulaire des bacilles englobés. Tout au contraire, c'est le polynucléaire qui subit les mé-

(48) M. A. MACHEBŒUF, J. DIERYCK et Mme Blanche DIERYCK, C. R. A. S. 1938, 206, 1058.

faits de son alimentation et très souvent la chromatolyse et la pycnose que l'on peut mettre en évidence dans son intérieur prouvent qu'il a été tué. Il survient alors une deuxième phase obligatoire dans toute infection tuberculeuse, la phase monocytaire. En particulier ce sont les gros mononucléaires, les macrophages de Metchnikoff qui accourent et englobent les polynucléaires détériorés avec les bacilles qu'ils avaient ingérés.

Cette phase mononucléaire obligatoire est-elle caractéristique de l'infection tuberculeuse ? En réalité elle s'observe souvent dans d'autres infections où elle n'est cependant pas obligatoire. Elle survient en particulier dans certaines infections comme celles dues aux pyocoques lorsque ces derniers sont d'une virulence relativement élevée. C'est seulement dans ce cas que la réaction polynucléaire n'atteint pas son but et que les mononucléaires phagocytent dans une deuxième phase les globules de pus avec des cocci souvent extracellulaires. Par contre, dans l'infection tuberculeuse, l'appel des mononucléaires est obligatoire et il s'effectue en particulier, quelle que soit la virulence des bacilles. Ainsi un bacille pratiquement avirulent comme le B.C.G. et même les bacilles tués par la chaleur font un appel monocytaire au même titre que les bacilles fortement virulents. Cet appel des macrophages est non seulement obligatoire dans l'infection tuberculeuse, mais il s'effectue même plus rapidement au cours de cette infection que dans d'autres où il est également nécessaire.

La réaction macrophagique a été décrite par METCHNIKOFF comme étant caractéristique, la présence de particules d'une taille relativement élevée tels que les détritres de tissus animaux ou les cellules du genre des globules rouges, tandis que la réaction polynucléaire devait être celle qui suit l'injection de particules de taille relativement plus petite, telles les bactéries. Mais nous savons que la réaction mononucléaire est caractéristique non seulement par la taille des particules, mais aussi par leur nature chimique et qu'en particulier les émulsions des graisses provoquent toujours une réaction macrophagique. Ce fait permettrait même de rattacher l'appel macrophagique au cours de

l'infection tuberculeuse à la présence de grosses quantités de substances lipoidiques dans le corps du bacille de Koch.

N'insistons pas sur ces considérations dépourvues de bases expérimentales précises et examinons ce qui arrive une fois l'afflux monocyttaire effectué. Comme dans toutes les autres infections, les macrophages englobent les bacilles et les polynucléaires plus ou moins endommagés qui ont phagocyté ceux-ci. Mais alors que la digestion intra-cellulaire des polynucléaires endommagés se fait avec une grande facilité, par les macrophages, les bacilles ne sont pas attaqués aussi rapidement, et se trouvent finalement intacts au sein du protoplasme des macrophages.

Nous aboutissons ainsi au même stade que dans le cas de l'englobement direct des bacilles libres. Apparemment les macrophages ne semblent pas souffrir de la présence des bacilles. Il paraît, au contraire, s'établir un certain équilibre de forces, le bacille pouvant persister dans le protoplasme du macrophage pendant un temps prolongé, des jours et même des semaines.

Cette inattaquabilité extraordinaire du bacille tuberculeux et des bacilles acidorésistants en général est remarquable, au sein d'un protoplasme auquel ne résistent guère que certains parasites endocellulaires comme les leishmanioses. N'avons-nous pas à chercher dans la constitution du bacille tuberculeux et en particulier dans ses substances lipoidiques la cause de cette indestructibilité ?

Nous avons vu, avec quelle facilité des acides gras non estérifiés peuvent être extraits à partir du corps bacillaire. Il peut, du reste, se former des acides gras à la suite d'un début d'attaque par des lipases du mononucléaire ; or il est connu que ces acides gras ou leurs savons peuvent inhiber aussi bien des lipases que des protéases. Ainsi le mononucléaire, quoique n'étant pas détruit aussi facilement que le polynucléaire, créerait lui-même dans la première phase de l'attaque les produits et les conditions qui permettraient au bacille tuberculeux de subsister.

Nous avons, d'autre part, consacré un chapitre entier à la discussion de l'acidorésistance. Nous en avons conclu

qu'elle est due à une substance appartenant au genre des cires. Cette substance acidorésistante ne pourrait-elle pas jouer, elle aussi, un rôle dans cette résistance du bacille tuberculeux à la digestion intracellulaire ?

F. R. SABIN, K. C. SMITHBURN, R. M. THOMAS (49), ont injecté cette substance à des lapins par voie intrapéritonéale et grâce à son acidorésistance, ces auteurs ont pu suivre ce qu'elle devenait. Or, ils ont observé que ces cires acido-résistantes sont extrêmement lentes à disparaître, beaucoup plus lentes que d'autres fractions du bacille tuberculeux comme les « phosphatides » ou la fraction acétonique qui, elles, sont assez rapidement détruites par les cellules.

Digestion intracellulaire

Les bacilles tuberculeux peuvent donc persister et même se multiplier à l'intérieur des macrophages, mais dans d'autres cas ils subissent la lyse intracellulaire.

Nous allons étudier plus loin ce que deviennent ces bacilles lorsqu'ils n'ont pu être digérés par les macrophages. Examinons pour le moment leur digestion intracellulaire. Nous devons, en effet, attacher une importance toute particulière à cette étude, l'immunité antituberculeuse et la guérison des affections bacillaires devant être liées étroitement à la destruction des bacilles tuberculeux par la digestion dans les cellules. Remarquons aussi que ce processus reste essentiellement le même, quel que soit le stade d'évolution du tissu tuberculeux dans lequel il survient.

La digestion des bacilles à l'intérieur des macrophages fut bien étudiée par BERGEL (50) chez la souris blanche. Au cours de cette digestion, on peut observer nettement la diffusion de la substance acidorésistante qui abandonne d'abord le corps du bacille englobé pour passer dans le protoplasme du phagocyte. A la place du bacille, il ne persiste plus que quelques granules qui prennent le Gram et qui

(49) F. R. SABIN, K. C. SMITHBURN, R. M. THOMAS, *Journ. Exper. Med.* 1935, 62, 751.

(50) BERGEL, *Beitr. Klin. Tuberk.* 1918, 38, 95.

doivent correspondre aux corpuscules de Much, puis ces granules diminuent également de volume et disparaissent à leur tour.

Comment s'opère donc cette digestion intracellulaire, l'acte le plus important de la phagocytose. Quelles forces y président ? Il s'agit certainement d'une action diastasi-que. Mais quelles diastases interviennent ici ? S'agit-il de protéases, de lipases ou d'une action plus ou moins combinée des deux ? La lyse est en général une protéolyse. Cependant, dans le cas particulier du bacille tuberculeux, il existe des preuves en faveur de l'hypothèse admettant que des lipases particulières interviennent aussi dans les processus lytiques.

Dans des expériences fort anciennes, KLING (51) a montré qu'on peut libérer, par destruction des globules blancs à l'aide d'agents physiques ou chimiques, des diastases non diffusibles, appelées par lui endolysines. Il a pu démontrer de plus que ces extraits ont la faculté de lyser les bacilles tuberculeux. On peut donc répéter cette lyse *in vitro* et démontrer qu'elle n'est pas liée à la vie de la cellule. Il s'agit probablement de diastases, mais nous ne savons rien sur leur nature.

Nous avons vu ci-dessus que les polynucléaires ne peuvent jamais digérer les bacilles tuberculeux et que les mononucléaires seuls peuvent aboutir à cette tâche.

Ne s'agirait-il pas de la présence, dans ces deux sortes de cellules, de diastases différentes ? En effet, FIESSINGER (52) a pu montrer la présence d'une lipase dans les leucocytes de la série lymphatique, la décelant aussi bien dans le pus tuberculeux que dans les ganglions lymphatiques et dans la rate, tandis que dans les cellules polynucléaires il n'y aurait pas de lipase. Ces derniers contiendraient surtout des protéases, beaucoup moins abondantes dans les mononucléaires. Il s'en suit, comme conclusion logique, que les mononucléaires seraient capables de détruire les bacilles tuberculeux grâce à leurs lipases.

(51) KLING, Ztschr. f. Immunitätsf. 1910, 7, 1.

(52) N. FIESSINGER, Les ferments des leucocytes, 1923, Masson et C^{ie}, édit., Paris.

D'autres arguments ont été apportés en faveur de l'importance de la lipolyse au cours de la destruction du bacille tuberculeux. Nous voulons parler en particulier des recherches de MÉTALNIKOV (53) sur la Mite ou Fausse-teigne des ruches d'abeilles (*Galleria mellonella*) dont la chenille vit aux dépens de la cire des rayons. En effet, cet auteur est parti de l'idée que des insectes qui se nourrissent de cires doivent être particulièrement aptes à digérer des substances aussi peu attaquables. Si l'indigestibilité des bacilles tuberculeux était alors réellement liée d'une façon ou d'une autre à la présence de substances cireuses, les chenilles des *Galleria* devaient pouvoir digérer facilement ces microorganismes. L'auteur a pu confirmer son hypothèse. En effet, quand on injecte des bacilles tuberculeux dans les chenilles, celles-ci les digèrent de façon parfaite dans le délai de quelques heures, sans aucun dommage pour leur vitalité et leur développement ultérieur en chrysalides et papillons.

Mais est-ce réellement une « céridase » particulière, une lipase capable de digérer les cires, qui conditionne l'immunité antituberculeuse des chenilles de *Galleria mellonella*.

En réalité, nous connaissons d'autres animaux plus ou moins résistants à l'infection tuberculeuse, animaux qui n'ont aucune raison de contenir des céridases. Le spermophile et la gerbille d'Algérie (54) ont été particulièrement bien étudiés de ce point de vue par Metchnikoff.

Nous savons aussi que le bacille aviaire n'est pas pathogène pour l'homme et inversement le bacille humain n'est pas pathogène pour la poule, pourtant le bacille humain comme le bacille aviaire contiennent tous les deux des cires et des acides gras libres. Nous nous approchons ainsi du problème de la spécificité des bacilles acidorésistants.

D'après BORDET, l'immunité naturelle des diverses espèces envers différentes souches, n'est qu'une question de rapport du leucocyte au bacille. Ce dernier serait résistant aux leucocytes d'une autre espèce. Toutes ces con-

(53) S. METALNIKOV, *Presse Médicale*, 1935, N° 48, 15 juin.

(54) METCHNIKOFF, *Leçons sur la Pathologie comparée de l'inflammation*, Paris 1892.

sidérations font partie du problème de la virulence et de nombreux facteurs qui nous échappent. Il est ainsi certain que la digestion des cires ne peut pas être le tout de l'immunité antituberculeuse, mais qu'elle peut jouer un rôle important dans celle-ci. En effet, l'immunité de *Galleria mellonella* est beaucoup plus frappante que celle des autres animaux; la dose mortelle du bacille tuberculeux (souche Vallée) pour la chenille est équivalente à 200.000 doses mortelles pour le cobaye.

De plus, dans ce cas, on a pu préparer des extraits qui attaquent les substances lipoïdiques et les cires; ils contiennent donc une lipase. Ces extraits agissent aussi sur le bacille tuberculeux: in vivo, injectés à l'animal, ils lui confèrent une immunité contre l'infection tuberculeuse; in vitro ils détruisent les bacilles tuberculeux. Nous voyons donc que ces extraits contiennent des lipases agissant sur les cires et qui sont actives envers le bacille tuberculeux.

Ainsi nous avons réuni un certain nombre de preuves en faveur de l'hypothèse attribuant à des lipases, peut-être de nature particulière, un rôle dans la digestion intracellulaire des bacilles tuberculeux. Il est certain que ces lipases ne peuvent nullement être considérées comme les uniques facteurs de l'immunité antituberculeuse. Par contre, on serait peut-être autorisé à conclure que l'indestructibilité et l'indigestibilité si caractéristiques des bacilles tuberculeux sont liées aux substances lipoïdiques en général et aux cires bacillaires en particulier. L'analogie est frappante; aussi ne pourrait-on pas considérer ces cires, substances essentiellement protectrices dans toute la série animale et végétale, comme une sorte de ciment qui rend impénétrable et très difficile à détruire les bacilles acidorésistants ?

FORMATION DE TISSU TUBERCULEUX

Cellules géantes

Dans le précédent chapitre, nous avons étudié la digestion intracellulaire des bacilles tuberculeux par les macrophages. En réalité, au moins dans le cas des organismes réceptifs à la tuberculose, les macrophages n'aboutissent qu'exceptionnellement à la destruction des bacilles par la digestion intracellulaire. C'est précisément la cause de la progression du processus tuberculeux conduisant à la formation de la cellule géante caractéristique de cette phase histopathologique.

En effet, la cellule géante est l'élément le plus caractéristique du tissu tuberculeux et un processus sans cellule géante doit être considéré comme tout à fait exceptionnel et atypique.

Si nous pouvons ainsi considérer que dans toute tuberculose nous rencontrons des cellules géantes, nous pouvons nous demander encore si celles-ci s'observent uniquement au cours de la tuberculose ou si nous en trouvons également dans d'autres affections. Or, nous sommes obligés de reconnaître que, dans les affections dues à d'autres bacilles, les uns acidorésistants comme la lèpre, les autres non acidorésistants comme la morve, nous pouvons déceler des cellules de cette nature. Enfin, celles-ci ont été rencontrées dans des affections causées par certains parasites, champignons, nématodes, acariens et sarcosporidies.

Non seulement des microorganismes vivants sont capables d'engendrer des lésions à cellules géantes, mais en plus on obtient celles-ci avec des bacilles morts : c'est ainsi que l'injection de bacilles tuberculeux tués par la chaleur provoque les mêmes lésions. Celles-ci ne sont pas dues à une manifestation vitale du bacille tuberculeux ; et de ce fait nous concevons tout l'intérêt des recherches chimiques, car si la matière inanimée donne ces

réactions cellulaires, on peut se demander si on ne peut pas préciser davantage et déceler la substance chimique qui causerait cette réaction.

Bien entendu, nous cherchons à savoir quel rôle pourraient jouer les substances lipoidiques dans ces réactions, mais la difficulté est la même que dans le cas des bactéries et des parasites. En effet, on peut provoquer la formation de cellules géantes avec toutes sortes de substances : le mercure, l'essence de térébenthine, la poudre d'euphorbe, la poudre de lycopode et ce qui nous intéresse particulièrement ici, avec des substances lipoidiques les plus diverses.

N'y a-t-il donc rien de spécifique dans la formation de la cellule géante au cours de la tuberculose ? Regardons le problème de plus près en examinant le mécanisme intime de la formation des cellules géantes. Dans la conception classique, autrefois généralement admise, toutes les cellules géantes se formaient de la même façon, qu'il s'agisse d'affections tuberculeuses, d'affections dues à des champignons, à des parasites ou même de l'introduction de certaines substances au sein des tissus. Incapables d'englober les particules directement, plusieurs leucocytes entourent d'abord le corps étranger (bacille, poudre inerte ou substance lipoidique insoluble), émettent des pseudopodes qui l'englobent, puis se fusionnent et finalement réunissent entre eux leur protoplasme de façon à former une cellule unique plus ou moins variable de taille et de structure selon la nature et le nombre des cellules qui l'ont formée.

Cette conception classique n'attribue donc, au cours de la tuberculose, aucun caractère spécifique à la formation des cellules géantes.

Mais, abandonnons maintenant les notions classiques et voyons les conceptions des auteurs américains de l'Institut Rockefeller. SABIN, DOAN et FORKNER (55) ont observé, dans les lésions tuberculeuses, à côté de ces cellules géantes, d'autres cellules qui seraient spécifiques pour l'affection tuberculeuse. Cette cellule spécifique serait formée non

(55) F. R. SABIN, Ch. A. DOAN et C. E. FORKNER, *Journ. Exp. Méd.*, 1930, 52, Suppl. 3. — F. R. SABIN, *Phys. Rev.*, 1932, 1214.

pas par fusion du protoplasme de plusieurs cellules, mais par division nucléaire amitotique à partir d'un seul monocyte. Elle demeurerait petite et de structure relativement uniforme, tandis qu'au contraire la fusion de la cellule « à corps étranger » que nous avons considérée jusqu'ici serait de taille et de structure des plus variables.

Et cette cellule spécifique « de type Langhans », serait caractéristique de la tuberculose. Elle ne se rencontrerait pas dans les autres affections et l'on ne pourrait provoquer sa formation avec des substances variées, comme nous l'avons vu pour la cellule géante à corps étranger.

Mais les auteurs américains ont pu produire les cellules géantes de type Langhans avec des bacilles morts. La formation de celles-ci n'est donc pas liée à une manifestation vitale du bacille tuberculeux. Ils ont montré encore d'autres faits : pour provoquer la formation de cellules géantes spécifiques, il ne faudrait pas injecter les bacilles morts entiers, mais simplement leurs lipides. Ce seraient donc des substances lipoïdiques qui rendraient actifs les bacilles entiers.

Cependant BOISSEVIN et RYDER (56) ont objecté qu'il suffit d'injecter moins d'un milligramme de bacilles morts pour déterminer l'apparition de formations cellulaires spécifiques, tandis qu'il faut injecter plusieurs dizaines de milligrammes de graisses pour causer la même lésion. D'autre part il est impossible de filtrer les graisses de façon à éviter à coup sûr l'entraînement de corps bacillaires. En effet, les bougies filtrantes, même les plus serrées, ne retiendraient pas les bacilles lorsqu'on filtre une solution dans un solvant organique. Donc ces auteurs sont enclins à conclure que, dans les expériences de SABIN et ses collaborateurs, ce ne sont pas les substances lipoïdiques qui ont provoqué la formation de tissus tuberculeux, mais les bacilles morts entraînés.

Pourtant ces objections ne sont pas entièrement valables. Tout d'abord il se peut que les substances, à action spécifique, lipoïdiques, soient précisément plus actives lors-

56) C. H. BOISSEVIN et C. T. RYDER, *Amer. Revue of Tubercul.*, 1931, 24, 751.

qu'elles sont liées à un support colloïdal plutôt que lorsqu'elles se trouvent simplement en émulsion aqueuse. En effet, le stroma glucoprotéïdique bacillaire pourrait assurer un certain degré de dispersion aux substances lipoïdiques et finalement on pourrait s'expliquer ainsi qu'un très faible poids de bacilles morts puisse aboutir au même effet qu'une masse relativement plus grande de substances lipoïdiques, bien que ce soient ces dernières qui agissent également dans les deux cas. L'objection, qui concerne la présence des bacilles morts dans les extraits lipoïdiques, a pu être réfutée aussi par Sabin et ses collaborateurs. En effet, ils ont pu produire du tissu tuberculeux, à l'aide de certaines fractions lipoïdiques obtenues après distillation dans le grand vide, (voir plus loin, p. 76) et dans ce cas celles-ci étaient sûrement exemptes de bacilles.

Nous pouvons donc conclure que ce sont bien des substances lipoïdiques contenues dans les corps bacillaires qui provoquent les réactions cellulaires les plus caractéristiques au cours de la tuberculose, et c'est bien du caractère spécifique de ces graisses que dépend la spécificité des réactions cellulaires observées.

En effet, SABIN, DOAN et FORKNER (55) n'ont jamais observé la formation de cellules géantes de type Langhans après des injections de lécithine, d'acides gras, d'huile d'olive, d'huile minérale. On n'obtiendrait dans ces conditions que des cellules géantes à corps étranger de formes les plus variables et en quantité beaucoup moindre.

Nous venons de voir que, suivant les auteurs américains, il faudrait admettre dans les lésions tuberculeuses deux sortes de cellules géantes :

l'une, à corps étranger, formée par fusion du protoplasme de plusieurs cellules, aspécifique et très répandue,

l'autre de type Langhans, formée à partir d'une seule cellule par division amitotique, spécifique pour la tuberculose ou au moins pour les affections à bacilles acidorésistants.

Nous avons vu que non seulement des bacilles vivants,

mais aussi des bacilles morts et même leurs constituants, pouvaient engendrer ces cellules géantes spécifiques.

Nous avons établi ensuite que, parmi ces constiituants, ce sont les substances lipoidiques extraites des bacilles tuberculeux et non des débris de corps bacillaires eux-mêmes qui déterminent les réactions spécifiques de la tuberculose. Nous avons vu, de plus, que ce sont exclusivement des substances lipoidiques extraites du bacille tuberculeux, ou au moins des bacilles acidorésistants, qui peuvent être rendues responsables de ces lésions spécifiques. Nous avons, de plus, établi que les autres substances lipoidiques rencontrées dans la nature en dehors de ces bacilles sont inactives.

Mais quelles sont ces substances lipoidiques ? Dans la première partie de ce travail, nous avons exposé longuement l'étude des substances chimiques, qui font partie du corps bacillaire. Parmi les substances particulières et hautement caractéristiques, nous avons reconnu les substances phosphorées, l'acide phtioïque et la substance acidorésistante.

Examinons donc comment ces divers composés prennent part à la constitution des lésions tissulaires dues au bacille tuberculeux.

Quand on injecte à plusieurs reprises des graisses phosphorées facilement émulsionnables dans l'eau, on observe un afflux de polynucléaires, à la première injection; par la suite ce sont les mononucléaires seuls qui englobent les particules émulsionnées.

Ces solutions, qui sont colloïdales, forment des figures comparables à la myéline, fait permettant de suivre le sort des substances lipoidiques à l'intérieur de la cellule. Après l'englobement, les particules sont dispersées en gouttelettes de plus en plus fines jusqu'à l'arrêt de cette dispersion au moment où la cellule se transforme en cellule épithélioïde typique. Certaines d'entre elles montrent ensuite la tendance à la prolifération, donnant ainsi la cellule épithélioïde de type Langhans spécifique de la tuberculose.

Mais ces réactions sont encore plus spécifiques quant à la nature chimique des substances qui les provoquent. En

effet, SABIN et ses collaborateurs ont pu montrer en se servant des diverses fractions lipoidiques (57) obtenues par l'école d'Anderson que non seulement les phosphatides bruts entiers sont actifs, mais aussi l'acide phtioïque * qui en est obtenu par saponification. Il est même possible que l'activité réactionnelle des phosphatides totaux soit due précisément à leur teneur en acide phtioïque, ce dernier donnant, en effet, des réactions spécifiques avec bien plus de netteté que les phosphatides totaux.

D'autres preuves plaident aussi en faveur de cette conception. En effet, non seulement les phosphatides, mais toutes les autres fractions lipoidiques obtenues à partir des bacilles tuberculeux, provoquent la formation de cellules géantes de type Langhans. La réactivité de ces graisses est toutefois variable de ce point de vue. D'ailleurs, on peut obtenir, au cours de ces fractionnements, des mélanges d'acides gras et d'insaponifiable qui ne contiennent pas d'acide phtioïque ; toute fraction qui en est dépourvue, a perdu par ce fait même le pouvoir de former des cellules de type Langhans.

ROULET (58) confirme les travaux de SABIN quant au rôle joué par les substances lipoidiques dans la production des lésions tuberculeuses. Par contre, il est moins affirmatif quant à l'importance qui doit être attribuée à l'acide phtioïque. En effet, il obtient facilement les formations histologiques spécifiques avec la fraction phosphatidique d'ANDERSON, tandis que les autres fractions paraissent moins actives quelle que soit leur teneur en acide phtioïque.

La conception de ROULET est partagée par BLOCH (59), qui

* Nous rappelons que l'acide phtioïque est un acide gras supérieur optiquement actif et tout à fait spécifique des graisses des bacilles tuberculeux. En effet, on n'a jamais rencontré d'acides gras comparables à l'acide phtioïque en dehors des graisses des bacilles acido-résistants. Il est intéressant de remarquer que l'acide tuberculostérique, l'autre acide liquide ramifié, presque tout aussi curieux que l'acide phtioïque, est inactif. Nous avons ici un cas très prononcé de spécificité chimique pour une réaction biologique.

(57) K. C. SMITHBURN et F. R. SABIN, *Journ. Exp. Med.* 1935, 61, 771.

(58) FR. ROULET, *Virchows Archiv.* 1935, 294, 262.

(59) K. BLOCH, *Ztschr. f. Physiol. Chem.* 1936, 244, 1.

fait jouer le rôle principal dans la production des lésions tuberculeuses à un constituant des phosphatides, l'acide phosphatidique *, ce qui revient à admettre que l'activité n'est pas due à l'acide phtioïque.

Toutefois nous pensons que la conception de SABIN et de ses collaborateurs doit être maintenue jusqu'à nouvel ordre. En effet, les constatations faites par ROULET et BLOCH sont bien moins précises que les résultats des travaux de SABIN et sont encore insuffisantes pour en affirmer la valeur.

Examinons maintenant le pouvoir réactionnel des cires bacillaires (49). Nous avons déjà mentionné qu'elles provoquent l'apparition de cellules géantes de type Langhans.

Par contre, les « cires insaponifiables », donc les substances acidorésistantes débarrassées par saponification (voir page 67) des acides gras, donnent, à un haut degré, les réactions des cellules géantes à corps étranger sans provoquer la formation de cellules de type Langhans. Les plus fines particules de l'émulsion injectée sont en partie phagocytées par les monocytes individuels et subissent simplement une digestion intracellulaire prolongée.

Les particules plus grandes, au contraire, sont d'abord cernées par les mononucléaires qui se fusionnent et entourent complètement les particules des cires insaponifiables ; la cellule géante ainsi formée les englobe finalement. Les cires englobées se trouvent d'abord cernées par les mononucléaires qui se fusionnent et entourent complètement les particules des cires insaponifiables ; la cellule géante ainsi constituée les englobe finalement. Les cires englobées se trouvent d'abord dans le protoplasme du phagocyte en fine dispersion donnant une réaction diffuse, rose au Ziehl, mais les petites particules s'agrègent ensuite et donnent l'acidorésistance typique, ce qui permet aisément de suivre l'action des cellules géantes sur les cires. Des particules acidorésistantes, sous forme de masses irrégulières, persistent pendant plusieurs mois au sein des cellules géantes.

* Il ne nous paraît pas inutile de remarquer que les graisses phosphorées possèdent encore une autre action très importante, celle d'agir comme haptène. En effet, MACHEBŒUF et ses collaborateurs ont réussi à obtenir des produits purifiés d'une activité très grande. (Voir aussi pages 13, 35 et 82).

Finalement la couleur rouge nette de la réaction de Ziehl vire au rose puis disparaît complètement. Les cellules géantes se résorbent peut-être, par scission, dans un processus trop lent pour être observé. Les graisses insaponifiables disparaissent donc par désintégration lente, jusqu'au moment où elles sont trop finement divisées pour manifester expérimentalement leur acidorésistance, mais apparemment elles n'ont pas d'action nocive sur les cellules qui les ont englobées.

La question est tout autre en ce qui concerne le sort des cellules ayant englobé les substances contenant l'acide phthioïque. Habituellement la cellule meurt, tantôt isolément, et elle est alors résorbée, tantôt en masse et nous assistons alors au processus de caséification. Pour une cellule prise isolément les auteurs américains décrivent le processus de la façon suivante. Les particules de substances grasses commencent par subir une dispersion intracellulaire, puis, subitement, cette dispersion s'arrête et le phagocyte montre des signes de dégénérescence cellulaire. Peut-être s'agit-il ici d'une incapacité physiologique de désintégration des acides gras qui pourraient alors agir de façon toxique comme ils ont agi en empêchant l'action des polynucléaires. (Voir page 64).

Caséification

Pour la caséification, la mortification des cellules ne suffit pas, il faudrait encore expliquer pourquoi ces cellules mortifiées ne sont pas résorbées. JOBLING et PETERSEN (60), dans une série de travaux, ont pu rendre probable qu'il s'agit, au cours de la caséification, d'inhibition de leuco-protéases par des savons d'acides gras non saturés.

Ils ont pu démontrer que les savons, surtout d'acides gras non saturés, inhibent l'action des leuco-protéases, action qui cesse quand on ajoute de l'iode qui sature les doubles liaisons. Ils ont extrait les acides gras des bacilles tuberculeux et ils ont vu que ceux-ci, sous forme de savons, empê-

(60) W. JOBLING et PETERSEN, *Journ. Exper. Med.* 1914, 19, 251, 383.

chent l'action des diastases protéolytiques des leucocytes. Ils se sont ensuite adressé au caséum et ont trouvé qu'il contient, lui aussi, des substances lipoidiques non saturées, empêchant sa digestion. En effet, les extraits éthéré et chloroformique du caséum inhibent fortement l'action protéolytique, tandis que celui-ci devient plus facile à digérer.

Nous voyons donc, qu'au niveau du caséum, des savons peuvent être incriminés pour l'inhibition de l'autolyse. Il faut cependant tenir compte du fait qu'il s'agit seulement, pour une faible part, des savons formés à partir des substances lipoidiques du bacille ; les lipides tissulaires, après leur désagrégation, peuvent jouer le même rôle.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Au cours des recherches que nous venons d'exposer, nous nous sommes efforcé de mettre en évidence les relations qui pouvaient exister entre les caractères histo-pathologiques de l'infection tuberculeuse et la constitution chimique des substances lipoïdiques des corps bacillaires. Dans ce très vaste sujet, trois points surtout ont retenu notre attention.

Tout d'abord nous avons reconnu que les acides gras libres des bacilles peuvent jouer un rôle dans la phagocytose ainsi que dans la digestion et la résorption intracellulaires.

Nous avons ensuite étudié d'une manière plus approfondie les fractions cireuses des constituants lipoïdiques du bacille de Koch et plus particulièrement la « cire acidorésistante ». Ce dernier élément nous est apparu comme étant tout à fait caractéristique des bacilles acidorésistants, non seulement peut-être au point de vue chimique, mais également au point de vue biologique. La résistance à la digestion intracellulaire, la vitalité extraordinaire des bacilles et surtout la résistance à la décoloration paraissent précisément être liées à la présence de cette fraction. Nos constatations à cet égard nous autorisent presque à considérer celle-ci comme une sorte de ciment à la fois intracellulaire et intermicellaire des corps microbiens. Cette conception, fondée sur des faits d'ordre physico-chimique, s'oppose nettement dans notre esprit à l'idée d'une coque ciro-graisseuse telle que certains auteurs la conçoivent encore.

Enfin, nous avons montré la relation frappante qui existe entre un acide gras caractéristique du bacille de Koch, l'acide phtioïque, et l'apparition, dans les tissus, d'un élément tout aussi caractéristique de l'infection tuberculeuse : la « cellule géante de Langhans » des auteurs américains.

Mais dans ce difficile problème, bien des points restent encore à résoudre en raison de difficultés qui sont surtout d'ordre chimique. Ainsi, sans disposer de preuves irréfutables de leur pureté chimique, nous avons décrit successivement les « cires acidorésistantes », puis l'acide phtioïque, etc. comme des entités chimiques et cependant il est probable qu'il ne s'agit que de mélanges ; il semble donc difficile de les considérer comme absolument caractéristiques et spécifiques du bacille tuberculeux. Il est même possible que des traces d'impuretés suffisent pour modifier considérablement l'activité de ces substances.

Nous n'avons étudié notre sujet que d'une manière unilatérale puisque nous n'avons pas examiné en particulier tous les autres éléments spécifiques qui, sans doute, interviennent dans la résistance de l'organisme à l'infection tuberculeuse. Il est probable d'ailleurs que dans les syndromes tuberculeux, les phénomènes qui se passent entre antigènes et anticorps spécifiques évoluent de la même manière que dans les autres infections.

L'étude de ces phénomènes nous aurait peut-être permis d'expliquer les différences de virulence qui séparent une souche de bacille tuberculeux d'une autre, et surtout les variétés pathogènes des variétés acidorésistantes saprophytes, mais nous avons considéré que ces questions dépassent les limites que nous avons assignées à nos recherches. Sans quoi nous aurions certainement étudié les acides phosphatidiques de MACHEBŒUF (61) qui semblent bien constituer l'haptène le plus important des constituants du bacille de Koch. (Voir pages 13, 35 et 77).

Certes nous ne nous dissimulons pas que nos recherches

(61) M. A. MACHEBŒUF, G. LÉVY et M. FAURE, C. R. Ac. Sc. 1935, 200, 1547. — 1937, 204, 1843.

n'ont pas complètement élucidé toutes les questions que nous avons examinées. Toutefois il nous semble que notre travail ne sera pas sans quelque utilité, d'abord parce que nous y avons sans cesse coordonné les faits chimiques avec les constatations biologiques, et enfin parce qu'il constitue un nouvel exemple de l'appui que les sciences physico-chimiques pourront donner aux sciences médicales. Rien n'est plus caractéristique de notre époque que cette tendance de la microbiologie de tirer parti des données chaque jour plus précieuses que lui apportent la chimie et la physique.

CONCLUSIONS

Nos travaux personnels ont apporté une preuve décisive en faveur de l'existence d'acides gras non estérifiés à l'intérieur des corps bacillaires. Nous avons démontré, d'autre part, que les extraits lipoidiques des bacilles tuberculeux empêchent la phagocytose *in vitro* et que cet empêchement pouvait être mis sur le compte des acides gras libres contenus dans ces extraits.

Nous avons insisté sur le fait que l'acidorésistance des bacilles tuberculeux est due à des « cires » particulières qui ne constituent qu'une proportion relativement petite des substances lipoidiques totales. Ces « cires acidorésistantes » sont hautement caractéristiques du groupe des bacilles acidorésistants en général et du bacille tuberculeux en particulier. Nous avons prouvé que la résistance du bacille tuberculeux envers des agents lytiques pouvait être attribuée précisément à ces substances. Nous avons, en outre, émis l'hypothèse que la distribution de ces cires à l'intérieur du corps bacillaire ne correspond pas à une coque. Il semble qu'elles constituent plutôt une sorte de ciment intracellulaire.

Nous avons finalement discuté la relation frappante qui paraît exister entre l'acide phthioïque très caractéristique du bacille tuberculeux et la formation histopathologique de la cellule géante de Langhans.

Vu : *Le Président de Thèse,*
POLONOVSKI.

Vu : *Le Doyen,*
M. TIFFENEAU.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	13
CHAPITRE PREMIER.	
Etude comparative de la constitution chimique et des caractères physico-chimiques des graisses des bacilles tuberculeux et celles des autres êtres vivants	17
a) ETUDE QUANTITATIVE DES SUBSTANCES LIPOÏDIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX	17
b) ETUDE COMPARATIVE DES GRAISSES DU BACILLE TUBERCULEUX ET DES GRAISSES DES AUTRES CELLULES VIVANTES ANIMALES OU VÉGÉTALES	22
c) CONSTITUTION CHIMIQUE DES SUBSTANCES LIPOÏDIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX	26
Glycérides.	26
Stérides.	27
Acides gras.	28
Acides gras non estérifiés (travaux personnels)..	30
Substances lipoidiques phosphorées	34
Cires.	36
Conclusions	41
CHAPITRE DEUXIEME.	
Histologie des bacilles tuberculeux et leurs substances lipoidiques..	43
a) ACIDORÉSISTANCE.	43
Fractionnement des substances acidorésistantes..	46
Recherche de l'acidorésistance	46
Fractionnement des substances lipoidiques.....	46
b) ORGANISATION DES BACILLES	52
CHAPITRE TROISIEME.	
Rapports entre les graisses du bacille tuberculeux et les lésions déterminées par ce bacille.	57
a) PHAGOCYTOSE.	58
<i>Réactions polynucléaires</i>	58
Action des acides gras non estérifiés	60
Mécanisme possible de la dégénérescence des polynucléaires.	63
<i>Réactions mononucléaires</i>	64
Digestion intracellulaire	67
b) FORMATION DE TISSU TUBERCULEUX	71
Cellules géantes.	71
Caséification.	78
DISCUSSION DES RESULTATS	81
CONCLUSIONS.	85

